



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA

PROYECCIONES GABAÉRGICAS Y NO-  
GABAÉRGICAS AL vRPO, REGIÓN PONTINA  
RESPONSABLE DE LA GENERACIÓN DEL  
SUEÑO REM EN EL GATO

TESIS DOCTORAL

SUSANA HEREDERO JUNG

2009

PROYECCIONES GABAÉRGICAS Y NO-  
GABAÉRGICAS AL vRPO, REGIÓN PONTINA  
RESPONSABLE DE LA GENERACIÓN DE  
SUEÑO REM EN EL GATO

Trabajo de investigación que presenta  
SUSANA HEREDERO JUNG

dirigido por la Profesora  
MARGARITA RODRIGO ANGULO

para optar al grado de  
DOCTOR

por la Universidad Autónoma de Madrid  
dentro del programa de Doctorado en Neurociencia  
del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia  
de la Facultad de Medicina de la  
Universidad Autónoma de Madrid

2009



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero mostrar mis agradecimientos a mi directora de tesis, la Dra. Margarita Rodrigo Angulo, por haberme iniciado en la investigación cuando era estudiante de Medicina, por su tutela durante los años posteriores y por su constante apoyo, paciencia, estímulo y dedicación hasta la finalización de esta tesis doctoral.

Agradezco especialmente al Profesor Fernando Reinoso Suárez el haberme aceptado para formar parte del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid en el programa de iniciación a la investigación básica durante mi licenciatura y posteriormente, en el programa de doctorado del mismo Departamento. Asimismo, quiero expresar mis agradecimientos por su supervisión, lectura y sugerencias para la realización de esta tesis doctoral.

Agradezco a la Dra. Elisia Rodríguez Veiga, del Departamento de Anatomía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por su inestimable colaboración para la elaboración y el estudio de los resultados obtenidos.

Asimismo, me gustaría agradecer especialmente la labor de la Dra. Carmen Fernández Criado, veterinario titular del gabinete veterinario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, así como al personal responsable del animalario, sin cuya aportación hubiera sido imposible la realización del trabajo experimental.

Muchas gracias a todo el personal del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Especialmente a las técnicas de laboratorio Marta Callejo, Gema de la Fuente y Rosa María Sánchez Lozano por su indispensable colaboración en la parte experimental del trabajo. Gracias también a todos los compañeros y profesores que me han mostrado su apoyo durante estos años, en particular al Dr. Ángel Núñez por su respaldo y al Dr. Enrique Martínez por haberme transmitido su pasión por el trabajo en el Departamento.

Por último, gracias a mi familia, mis padres, mis hermanos y mi marido, que han sabido brindarme su cariño y paciencia todo este tiempo.

*A mis padres.*

## ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Historia reciente de la investigación en sueño	4
1.2. Las fases del ciclo vigilia-sueño en el hombre	8
1.3 Las fases del ciclo vigilia-sueño en el gato	10
1.4 Estructuras nerviosas y neurotransmisores responsables de las fases del ciclo vigilia-sueño	13
1.5 Generación y mantenimiento del sueño REM. El vRPO	21
1.6 La implicación de los sistemas GABAérgicos en el sueño	27
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1 Material biológico utilizado	35
3.2 Procedimiento quirúrgico	35
3.3 Procesamiento del tejido	41
3.4 Estudio del material histológico	47
3.5 Análisis de datos cuantificables	48
4. RESULTADOS	49
4.1 Localización de las inyecciones del trazador	49
4.2 Distribución de las neuronas GAD-positivas	51
4.3 Distribución de las neuronas CTb-positivas	53
4.4 Distribución de las neuronas CTb y GAD-positivas	55
5. DISCUSIÓN	79
5.1 Consideraciones generales	79
5.2 Las proyecciones GABAérgicas al vRPO	80
5.3 Las proyecciones no-GABAérgicas al vRPO	85
5.4 La interacción específica entre el GABA y la acetil-colina	89
5.5 Consideraciones finales	91
6. CONCLUSIONES	93
7. BIBLIOGRAFÍA	95
8. ANEXO	111

## ABREVIATURAS

3: núcleo del nervio ocular común  
4: núcleo del nervio troclear  
6N: nervio abducens  
7N: nervio facial  
12N: nervio hipogloso  
 $\alpha$ : locus coeruleus alfa  
AAA: área amigdalina anterior  
AC: comisura anterior  
ACe: núcleo central de la amígdala  
AHA: área hipotalámica anterior  
Aq: acueducto de Silvio  
AP: plano anteroposterior  
BNSTl: parte lateral del núcleo del lecho de la estría terminal  
BNSTm: parte medial del núcleo del lecho de la estría terminal  
BC: brachium conjunctivum  
BP: brachium pontis  
BRF: formación reticular bulbar  
CI: colículo inferior  
Cm: núcleo centromediano del tálamo  
Cn: núcleo cuneiforme  
CP: comisura posterior  
CS: núcleo central superior del rafe  
CVS: ciclo vigilia-sueño  
DcH: núcleo hipotalámico dorsocaudal  
DH: área hipotalámica dorsal  
DM: núcleo dorsomedial del tálamo  
DmH: área hipotalámica dorsomedial  
DR: núcleo dorsal del rafe  
Fo: fornix  
EW: núcleo de Edinger Westphal  
Gc: núcleo bulbar gigantocelular  
GP: globo pálido  
G7: rodilla del nervio facial  
H1: campo H1 de Forel  
HDM: núcleo hipotalámico dorsomedial  
HVM: área hipotalámica ventromedial  
IC: capsula interna  
Ip: núcleo interpeduncular  
LC: locus coeruleus  
LdT: núcleo del tegmento laterodorsal  
LG: núcleo geniculado lateral  
LGV: núcleo geniculado lateral ventral  
LH: área hipotalámica lateral  
LHa: núcleo lateral de la habénula  
LL: lemnisco lateral  
LPo: área preóptica lateral  
MG: núcleo geniculado medial  
ML: lemnisco medio  
MLF: fascículo longitudinal medial  
MN: núcleo mamilar  
MPo: área preóptica medial  
MRF: formación reticular mesencefálica  
Mt: haz mamilotalámico

NC: núcleo caudado  
NR: núcleo rojo  
OI: oliva inferior  
OS: oliva superior  
OT: tracto óptico  
P: haz piramidal  
PaG: sustancia gris periaqueductal  
PaH: núcleo hipotalámico paraventricular  
PeT: núcleo periventricular del tálamo  
Pf: núcleo parafascicular del tálamo  
PeFo: área perifornical  
PH: área hipotalámica posterior  
PoMn: núcleo preóptico mediano  
PP: pie peduncular  
PpT: núcleo del tegmento pedunculopontino  
Pα: perilocus coeruleus alfa  
RB: fascículo retroflejo  
RPC: núcleo reticular caudal del puente  
RPO: núcleo reticular oral del puente  
RT: núcleo reticular del tálamo  
SC: colículo superior  
SCP: pedúnculo cerebeloso superior  
SI: sustancia innominada  
SLC: núcleo subcoeruleus  
SN: sustancia negra  
ST: estría terminal  
SV: núcleo espinal del trigémino  
TD: núcleo tegmental dorsal  
Tm: núcleo tuberomamilar  
Tp: núcleo tegmental del puente  
Tr: núcleo trapezoide  
VA: núcleo ventral anterior del tálamo  
VM: núcleo ventral medial del tálamo  
VP: núcleo ventral posterior del tálamo  
vRPO: parte ventral del RPO  
VTA: área temental ventral de Tsai  
ZI: zona incerta

# *1. INTRODUCCIÓN*



## 1. INTRODUCCIÓN

La palabra *sueño* procede del latín *somnum* y hace referencia tanto al acto de dormir como al deseo de hacerlo (tener sueño), así como a cualquier anhelo o ilusión que puede movilizar a una persona. Desde los albores de la historia, el sueño ha (irónicamente) despertado el interés de grandes científicos y pensadores, desde Aristóteles e Hipócrates hasta Freud y Pavlov, que han tratado de establecer bases fisiológicas y psicológicas que expliquen qué estructuras y mecanismos son responsables de producir el sueño, cuál es el significado y la necesidad de los ensueños y cómo se pueden tratar enfermedades tales como el insomnio, la narcolepsia o la apnea del sueño, causadas por la falta, el exceso o las disfunciones del sueño.

Muchas funciones fisiológicas, tales como la regulación de la temperatura corporal, la liberación de hormonas o el sueño suceden con una periodicidad de aproximadamente 24 horas, característica de los ritmos biológicos circadianos. El sueño y la vigilia en el hombre es un ejemplo de ritmo biológico, que se denomina ciclo vigilia-sueño (CVS), y que ocurre durante toda la vida con una estricta periodicidad circadiana: desde el CVS polifásico del recién nacido hasta el monofásico del adulto, pasando por el ciclo bifásico de los niños, que duermen una siesta después de la comida. Los ritmos circadianos son endógenos, ocurren sin necesidad de estímulos exteriores, por lo que requieren un marcapasos interno. Aunque el CVS está condicionado por factores ambientales y sociales, en condiciones normales está regulado por un poderoso estímulo temporizador, la luz solar, que está relacionada con la fase activa de este ciclo; por esta razón, el hombre adulto duerme de noche, cuando está oscuro. El marcapasos interno del CVS es el núcleo supraquiasmático del hipotálamo; la información luminosa que incide en la retina se transporta por medio del haz retinohipotalámico hasta el núcleo supraquiasmático, que regula así el horario del sueño, aunque no es responsable del sueño mismo.

El sueño es un estado fisiológico periódicamente necesario, involuntario e inevitable, que se puede revertir mediante un estímulo adecuado; está caracterizado por un disminución de la actividad sensorial y motora acompañada de una pérdida reversible de la conciencia, por una disminución de la respuesta a estímulos externos, por una postura característica, y por un trazado electroencefalográfico particular. Pasamos un tercio de nuestra vida durmiendo. Parece un tiempo lastimosamente perdido. ¿Por qué

tenemos tanta necesidad de sueño?. Desde un punto de vista cotidiano el sueño tiene una finalidad reparadora de los desequilibrios que acontecen durante la vigilia, sobre todo de la fatiga. Sin embargo, el sueño es un amalgama muy complejo de procesos fisiológicos al que se le han atribuido múltiples funciones: conservación de la energía metabólica, recuperación después de un rendimiento físico o intelectual, regulación de la temperatura corporal, detoxificación cerebral, restauración tisular, plasticidad neuronal, consolidación de la memoria, aprendizaje, cognición y comportamiento (Kuriyama et al 2008, Vassalli and Dijk 2009); sin embargo aunque hasta el momento ha habido un rápido aumento del conocimiento de los procesos que generan y mantienen el sueño y se han propuesto varias teorías acerca de sus funciones, no hay todavía una respuesta satisfactoria para explicar la finalidad de una conducta fisiológica que, aparentemente, solo es necesaria para disfrutar de una vigilia provechosa.

### **1.1 Historia reciente de la investigación en sueño**

La investigación moderna sobre el sueño comienza en 1928, cuando el psiquiatra alemán Hans Berger, registrando la actividad eléctrica en el cerebro humano, que él llamó electroencefalograma (EEG), demostró que había una clara diferencia en los ritmos de dicha actividad cuando los sujetos estaban despiertos o dormidos; describió un EEG activado de bajo voltaje y alta frecuencia característico de la vigilia, y un EEG desactivado de ondas lentas de alto voltaje y baja frecuencia característico del sueño (Berger 1930). Por primera vez se podía demostrar de forma concluyente la manifestación de un estado de sueño que además se podía medir cuantitativamente sin molestar al durmiente.

A mediados de los años 30, Davis, Harvey y Hobart, investigadores de la Universidad de Harvard, con el concurso de Loomis, un físico de la Universidad de Princeton que había diseñado un electroencefalógrafo, describieron el primer EEG de un durmiente aportando el interesante descubrimiento de que el cerebro no descansa mientras dormimos si no que permanece activo aunque esta actividad no es uniforme ni igual que la de la vigilia (Davis et al 1937, 1938; Harvey et al 1937).

El desarrollo de las investigaciones sobre el EEG fueron la base de los estudios que, también en ese mismo tiempo, estaba realizando en Europa un investigador belga, Frédéric Bremer, partidario de la teoría de la desaferentización, por entonces en boga, la cual proponía que el cerebro privado de impulsos sensoriales es incapaz de mantener el

estado de vigilia; era una teoría pasiva del sueño, el sueño era simplemente la ausencia de vigilia. Para apoyar esta teoría, en su laboratorio de Bruselas, Bremer estudiaba los patrones de las ondas de actividad de la corteza cerebral en dos preparaciones experimentales que realizaba en el gato.

La primera preparación, que él llamó *cerveau isolé* (cerebro aislado), se realiza haciendo una transección entre los dos colículos del mesencéfalo justo detrás de la salida de los nervios oculomotores, es decir, haciendo una desaferentización; la actividad cortical queda solo bajo la influencia de impulsos olfativos y visuales. Como resultado de este experimento observaba que, tras la transección, los animales quedaban permanentemente en un estado de somnolencia y que sus EEGs presentaban las ondas lentas de gran amplitud típicas del estado de sueño. Bremer llegó a la conclusión de que el prosencéfalo estaba dormido porque había sido privado de la estimulación proveniente de la superficie corporal, de los oídos y de los receptores articulares profundos (Bremer 1935).

Esta conclusión fue casi inmediatamente desbancada por los resultados de su siguiente experimento. La segunda preparación, *encephale isolé* (encéfalo aislado), consiste en realizar un sección en la parte baja del bulbo, lo que permite estudiar la actividad eléctrica de la corteza cerebral bajo la influencia de los impulsos olfativos, visuales, auditivos y vestibulares. El resultado de este experimento fue que tanto la conducta de los animales como los signos eléctricos mostraban una vigilia exacerbada: los animales quedaban en un estado permanente de vigilia. Este resultado fue inesperado pues esta hipervigilancia se producía a pesar de que los impulsos sensitivos musculocutáneos y de los receptores articulares profundos no alcanzaban el cerebro. Bremer concluyó que existía un control activo del sueño en el propio tronco del encéfalo, en un nivel que quedaba entre las dos transecciones (Bremer 1935).

Sin embargo, los trabajos de estos investigadores de los años 30 favorecieron el concepto del sueño como un fenómeno pasivo debido a una reducción de la actividad neuronal.

A finales de la primera mitad del siglo XX, cuando terminó la Segunda Guerra Mundial y la teoría pasiva del sueño todavía estaba en auge, se reinició la investigación en Neurofisiología y se desarrollaron las técnicas de implantación de electrodos de registro y de estimulación. Giuseppe Moruzzi y Horace Magoun fueron dos investigadores que empleaban estas técnicas para estudiar la actividad motora utilizando

también el gato como animal de experimentación. Colocaban electrodos de estimulación en el tracto piramidal del tronco del encéfalo para estimular las neuronas de la corteza motora, cuyos axones pasaban por el tronco del encéfalo, y registraban el EEG mediante electrodos de registro colocados en la corteza motora. Observaron que, cuando variaban los parámetros de estimulación, la actividad EEG de ondas lentas típicas del estado de sueño, se convertía en una actividad rápida de bajo voltaje típica del estado de vigilia acompañada de una conducta de despertar que además se mantenía durante todo el tiempo que duraba la estimulación. Moruzzi y Magoun (1949) comprobaron que sus electrodos de estimulación estaban situados en la formación reticular del tronco del encéfalo, una compleja región ocupada por una maraña de células y fibras que desde entonces se conoce como el *sistema reticular ascendente de activación*, y que estaba localizada ente los dos niveles de transección descritos por Bremer. Sin embargo, el efecto de activación de la corteza cerebral se podía obtener cuando se estimulaba cualquier zona de la formación reticular desde el bulbo hasta el hipotálamo.

Para comprobar sus resultados, estos investigadores lesionaron la formación reticular dejando intactas las vías sensitivas con el resultado de que el prosencéfalo presentaba un patrón de ondas del estado de sueño en el EEG; del mismo modo, el resultado de la lesión restringida de las vías sensitivas no produjo somnolencia en el animal, ni un EEG de ondas lentas. Con estos datos Moruzzi y Magoun enunciaron su teoría reticular del sueño, en la que mantenían que la actividad tónica del sistema reticular ascendente de activación impulsada por vías sensitivas era responsable de la activación del EEG y de mantener despierto al prosencéfalo, mientras que su lesión producía sueño (Moruzzi and Magoun 1949). Estos hallazgos revolucionarios descartaron el concepto del sueño como un proceso pasivo de desaferentización y favorecieron la teoría del sueño como un proceso activo controlado por el sistema nervioso central.

Una década mas tarde, el grupo de Moruzzi trataba de precisar una región del tronco del encéfalo responsable de la activación del EEG, haciendo dos transecciones en el tronco del encéfalo por delante de la entrada del nervio trigémino, una nivel rostral y otra a nivel medial, para aislar al prosencéfalo de la sensibilidad de la cara y la cabeza. La diferencia entre las dos preparaciones fue que en la preparación pretrigeminal rostopontina el animal tiene husos de sueño mientras que la preparación pretrigeminal mediopontina produce que el animal presente durante el 90% del tiempo un EEG y una conducta de vigilia. Por lo tanto, parecía que la formación reticular del tronco del

encéfalo es una estructura compleja con funciones tanto hipnogénicas como vigilantígenas, que la estimulación sensorial no es responsable (ni siquiera necesaria) para la activación del cerebro, y que, por el contrario, hay estructuras entre el puente y la parte mas rostral del tronco del encéfalo capaces de mediar por si solas en la conducta del despertar y en la activación del prosencéfalo (Batini et al 1958, 1959a).

Fue en la segunda mitad del siglo XX cuando se realizó el importante descubrimiento de las fases del sueño. Al comienzo de los años 50 a ningún investigador trabajando en un laboratorio dedicado al sueño en humanos se le había ocurrido pasar toda la noche registrando el sueño de un sujeto; lo que se conocía de los patrones de EEG o de la fisiología general durante el sueño se refería a episodios cortos e intermitentes de sueño en cualquier momento. Por aquel entonces Nathaniel Kleitmann, Profesor de Fisiología y uno de los mejores expertos del mundo, se dedicaba a registrar EEG de sueño en su laboratorio de la Universidad de Chicago. Eugene Aserinsky, un estudiante de doctorado que hacía guardias nocturnas en dicho laboratorio, estaba interesado por los movimientos oculares durante el sueño, que ya se conocían, y convenció a Kleitmann para registrarlos gráficamente durante periodos prolongados de tiempo; los resultados del trabajo se publicaron en apenas dos hojas de la revista Science (Aserinsky and Kleitmann 1953). Estos investigadores interpretaron que estos movimientos oculares representaban un sueño ligero y puesto que también estaban asociados a una respiración irregular y a un aumento de la frecuencia cardiaca lo consideraron un estado fisiológicamente diferenciado y bautizaron este tipo de sueño con el nombre de sueño REM (*rapid eye movements*). Aunque este trabajo no atrajo al principio mucha atención, William Dement, en la Universidad de Stanford, estableció que una fase idéntica de sueño ocurría también en gatos (Dement 1958). Casi al mismo tiempo un neurocirujano de la Universidad de Lyon que conocía estos trabajos, Michel Jouvet, había observado que los gatos que entraban en sueño REM perdían el tono muscular y que, para su sorpresa, el patrón del EEG era activado igual que en vigilia. Jouvet dio a este tipo de sueño el nombre de *sueño paradójico* debido a la paradoja de que el cerebro del aparentemente dormido animal, estaba internamente despierto (Jouvet et al 1959). Se trataba pues de una fase de sueño activo, y desde entonces el sueño con el patrón del EEG de ondas lentas, que se consideraba el normal, pasó a denominarse sueño no-REM.

Que el sueño podía estar bajo un control activo ya lo había sugerido en 1931 un investigador suizo de la Universidad de Zurich, Walter Hess, que había descubierto que

la estimulación rítmica a muy baja frecuencia del hipotálamo y prosencéfalo basal podía producir un EEG de ondas lentas y conducta de sueño en el gato (Hess 1931). Aunque sus resultados fueron muy discutidos, ya que los mecanismos diencefálicos eran considerados secundarios a los mecanismos relacionados con el sistema reticular ascendente de activación del tronco del encéfalo, Hess recibió por sus trabajos el Premio Nobel de Medicina y Fisiología del año 1949. Pero esto también lo apoyaban los trabajos de Morison y Dempsey que estimulaban a baja frecuencia los núcleos intralaminares del tálamo y obtenían respuestas de reclutamiento con un patrón del EEG similar al de los husos de sueño (Morison and Dempsey 1942).

En un periodo ya posterior, experimentos de estimulación eléctrica y lesión en distintos centros a lo largo del neuroeje demostraron que tanto estructuras prosencefálicas como de los niveles caudales del tronco del encéfalo estaban implicadas en el CVS. La estimulación eléctrica o química del prosencéfalo basal y la corteza orbitaria produce también que el animal entre en fase de sueño (Serman and Clemente 1962; Hernández-Peón 1965). La estimulación de la formación reticular bulbar produce también sincronización del EEG (Cordeau and Mancía 1959, Moruzzi 1960); por otra parte las lesiones del tegmento pontino caudal producían también vigilia y activación del EEG (Batini et al 1959b, Camacho-Evangelista and Reinoso-Suárez, 1964).

El resultado de las investigaciones que se realizaron en el último siglo fue que el sueño dejó de ser considerado como un fenómeno pasivo para pasar a ser un fenómeno activo y que en el CVS están implicados un sistema hipnogénico rostral, otro caudal y un sistema vigilantígeno situado entre ambos.

En la última década los estudios sobre el sueño se están llevando a cabo de forma multidisciplinaria, que incluye la neuroanatomía, neurofisiología y neuroquímica, los sistemas neurobiológicos, y los mecanismos celulares, genéticos y moleculares (Hobson and Pace-Schott 2002, Pace-Schott and Hobson 2002, Kilduff et al 2008, Franken et al 2009, Franken and Dijk 2009, Vassalli and Dijk 2009; ver para mas referencias Borbély and Achermann 2000).

## **1.2 Las fases del ciclo vigilia-sueño en el hombre**

El CVS en el hombre sigue un ritmo circadiano y nictameral de aproximadamente veinticuatro horas, en el que el dador del tiempo se identifica con el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. El ciclo CVS se puede dividir en tres fases: vigilia,



sueño no-REM y sueño REM, que se alternan cíclicamente siguiendo un patrón estructurado (Kleitman 1963). El término “sueño no-REM” no es demasiado afortunado pues define un fenómeno por la ausencia de unas características que sí están presentes en el sueño REM, por eso también se denomina sueño de ondas lentas o sincronizado (alusivo a las características del EEG), sueño profundo (definido por la intensidad del estímulo necesario para producir el despertar), o sueño tranquilo (que describe la relativa tranquilidad del durmiente). Por el contrario, el sueño REM se puede también designar como sueño desincronizado o sueño activo.

El estado de sueño no es uniforme si no que las fases de sueño REM y sueño no-REM están organizadas en ciclos. El paso entre cada de una de estas fases se hace de una forma secuencial, y se han definido los criterios para registrar y clasificar cada una de las fases (Rechtschaffen and Kales 1968). Para definir la fase de sueño hay que atender a parámetros conductuales y a parámetros electrofisiológicos que se pueden medir mediante registros poligráficos. Durante el sueño el individuo está en posición relajada, acostado y con los ojos cerrados. La actividad electrofisiológica se mide mediante la colocación convencional de electrodos sobre el cuero cabelludo, a ambos lados de los ojos, y en el mentón, lo que permite registrar la actividad eléctrica del EEG, de los movimientos oculares (electrooculograma o EOG) y de la musculatura antigravitatoria (electromiograma o EMG).

Cuando el individuo apaga la luz y se dispone a dormir entra en la Fase 0, está despierto y presenta un EEG activado o desincronizado caracterizado por ondas de bajo voltaje (10-30  $\mu$ V) y alta frecuencia ( $>13$  Hz), es el ritmo  $\beta$ ; cuando el individuo se relaja y cierra los ojos aparece en el EEG una actividad de unos 20-40  $\mu$ V y frecuencia de 8 a 12 Hz, es el ritmo  $\alpha$  (Tabla 1.1). La Fase 0 dura unos minutos y a continuación el individuo se duerme entrando en sueño no-REM, que consta de 4 fases durante las cuales las ondas del EEG experimentan progresivamente un aumento de la amplitud y disminución del voltaje, característico de un EEG sincronizado o desactivado. La Fase 1 presenta en el EEG ondas de bajo voltaje y mezcla de frecuencias, cierta actividad del músculo esquelético y ausencia de movimientos oculares rápidos (Tabla 1.1). La Fase 2 se caracteriza por la aparición en el EEG de ondas sinusoidales denominadas husos de sueño (12 a 14 Hz), y ondas bifásicas de alto voltaje, los complejos K, que surgen de forma episódica sobre una actividad continua de bajo voltaje. Las dos siguientes fases se suelen agrupar como Fase 3-4 y es la fase que se conoce también como fase de sueño

lento, ya que el EEG muestra ondas lentas de la banda  $\delta$  (0.5 a 2 Hz) de baja amplitud cuyo número se incrementa a lo largo del tiempo hasta dominar el registro del EEG (Tabla 1.1). Cuando han pasado unos 90 minutos, el individuo entra en sueño REM, el EEG revierte a un patrón de bajo voltaje y frecuencias mezcladas semejante al de la Fase 1 de sueño no-REM, la gráfica del EMG es una línea recta, es decir, la musculatura está totalmente relajada y el durmiente está como paralizado; de vez en cuando los ojos giran libre y enérgicamente, y si el individuo se despierta en ese momento, será consciente de que estaba soñando (Tabla 1.1). Aunque un individuo entrenado puede relatar un ensueño cuando se le despierta en fase de sueño no-REM, todos los autores están de acuerdo en que los ensueños mas vívidos y mejor estructurados ocurren durante la fase de sueño REM.

Este ciclo de sueño no-REM y sueño REM se repite normalmente de 4 a 6 veces durante la noche.

	EEG	EOG	EMG
<b>VIGILIA</b> Fase 0	ACTIVADO Ojos abiertos – ritmo $\beta$ (>13Hz y bajo voltaje) Ojos cerrados – ritmo $\alpha$ (8-12Hz y bajo voltaje)	Movimientos relacionados con visión / Ausencia en reposo	Tono y movimientos musculares mantenidos
<b>SUEÑO NO-REM</b> Fase 1 Adormecimiento	SINCRONIZADO Ritmo mezclado (ritmo $\alpha$ y ondas $\theta$ de 4-7Hz)	Ausencia	Tono muscular reducido
Fase 2 Sueño ligero	Husos de sueño y/o complejos K (ondas bifásicas de alto voltaje)	Ausencia	Tono muscular reducido
Fase 3-4 Sueño lento	Ondas delta (0,3-3Hz) al menos el 20% del trazado (fase 3) o el 50% (fase 4)	Ausencia	Tono muscular reducido
<b>SUEÑO REM</b>	ACTIVADO	Movimientos oculares rápidos (REM)	ATONÍA (excepción: músculos oculares, del oído medio y diafragma)

Tabla 1.1- Fases del ciclo vigilia-sueño en el hombre

### 1.3 Las fases del ciclo vigilia-sueño en el gato

Los ciclos de reposo y actividad son un fenómeno común a todos los animales, todos ellos gozan a diario de fases de reposo durante las cuales experimentan una

disminución de la actividad y la sensibilidad. Sin embargo, el sueño definido por características de comportamiento y por patrones electroencefalográficos característicos, es un fenómeno privativo de los animales de sangre caliente, es decir, de las Aves y de los Mamíferos. En muchas especies animales se han descrito distintos patrones electroencefalográficos y de comportamiento característicos de un CVS específico.

El animal mas utilizado para la investigación sobre el sueño es el gato, en parte debido a que apenas hay la variación del tamaño y forma de la cabeza en las distintas razas, lo que ha permitido realizar atlas de coordenadas estereotáxicas muy fiables (Jasper and Ajmone-Marsan 1954, Reinoso-Suárez 1961b , Bleier et al 1966, Berman 1968, Avendaño and Reinoso-Suárez 1975); por otra parte, las fases del CVS que se han descrito en el gato (Serman et al 1965) son semejantes y extrapolables a las del hombre. El gato de laboratorio pasa una gran parte del tiempo durmiendo; las fases de sueño no-REM no están tan bien definidas como en el hombre, por lo que se suele designar a esta fase como sueño lento en general; para la fase de sueño REM se utiliza también indistintamente el término de sueño paradójico.

Cuando el animal va a entrar en un ciclo de sueño (Tabla 1.2), comienza por una fase de vigilia tranquila que se caracteriza por un EEG de trazado rápido y de bajo voltaje (desincronizado o activado), con ondas  $\beta$  y ausencia de ritmo  $\alpha$ . Precediendo a la fase de sueño lento, el animal pasa por una fase que se puede clasificar como somnolencia pues es una fase semejante al adormecimiento en el hombre; esta fase se caracteriza por un EEG desincronizado y por la aparición de husos de sueño junto a los ritmos rápidos, y da paso a la fase propiamente dicha de sueño lento que presenta un EEG progresivamente mas sincronizado de trazado típico de ondas lentas de la banda  $\delta$ . Después de pasar una cantidad considerable de tiempo (hasta 2 horas) en sueño lento, el animal entra en sueño REM. El sueño REM está muy bien caracterizado en el gato ya que el animal es susceptible de experimentación y se le pueden implantar electrodos profundos de registro en distintas estructuras encefálicas; como norma general y para una mejor definición de esta fase, además de los electrodos convencionales para registro del EEG, al animal se le suelen implantar estereotáxicamente electrodos de registro en el núcleo geniculado lateral y en el hipocampo dorsal, ya que la actividad eléctrica de estas dos estructuras es muy peculiar durante la fase de sueño REM.

Por tanto, el sueño REM se puede definir poligráficamente por una serie de indicadores que son tónicos y fásicos. Los indicadores tónicos son: a) el EEG

desincronizado semejante a la de la vigilia, b) el EMG, que se registra en la musculatura de la nuca, muestra que el tono muscular está abolido aunque pueden aparecer sacudidas musculares esporádicas y c) la aparición de ritmo  $\theta$  en el hipocampo, semejante también al que se registra durante la vigilia. Los indicadores fásicos son: la aparición en el EOG de los movimientos oculares rápidos (REMs), que pueden aparecer aislados o en salvas y b) la aparición en el registro del núcleo geniculado lateral de unas puntas rápidas, bifásicas, inicialmente negativas, de bajo voltaje y gran amplitud. Estas puntas fueron ya observadas por el grupo de Jouvet (Jouvet et al 1959) que describieron estos potenciales eléctricos que se originan inicialmente en la formación reticular del puente, para propagarse después al núcleo geniculado lateral y a la corteza occipital. Por esta razón estas puntas se denominan puntas ponto-genículo-occipitales (PGO) y son uno de los indicadores mas fiables para caracterizar el sueño REM. Las PGO preceden al sueño REM, suelen aparecer unos 30 segundos antes de su aparición, y se presentan en salvas normalmente asociadas a los movimientos oculares rápidos.

Además, se puede observar que en cada una de las fases el animal adopta una postura diferente; durante las fases de somnolencia y sueño lento el animal está sentado en lo que se llama posición de esfinge, con la cabeza y el cuello erguidos y los ojos cerrados; en sueño lento está apoyado o tumbado, pero con la cabeza erguida; cuando el animal está en sueño paradójico, la cabeza está caída en el suelo y no mantiene el tono muscular (Tabla 1.2).

	EEG	EOG	EMG	Comportamiento
<b>VIGILIA</b>	ACTIVADO  Alta frecuencia y bajo voltaje (ondas $\beta$ ) No hay ritmo $\alpha$	Movimientos oculares frecuentes y rápidos	Tono y movimientos musculares mantenidos	Posición: de erguido a tumbado Cabeza: erguida Ojos: abiertos
<b>SUEÑO LENTO</b> Somnolencia  Sueño lento	SINCRONIZADO  Ritmo rápido Husos de sueño Ritmo de bajo voltaje y frecuencia intermedia Husos de sueño	Infrecuentes  Ausencia	Tono muscular mantenido Variable, generalmente tono mantenido	Posición: esfinge Cabeza: erguida Ojos: ½ a ¼ cerrados Posición: tumbado Cabeza: erguida o no Ojos: cerrados
<b>SUEÑO REM</b>	ACTIVADO	Movimientos oculares rápidos (REM)	ATONÍA	Posición: tumbado Cabeza: siempre caída Ojos: cerrados

Tabla 1.2.- Fases del ciclo vigilia-sueño en el gato

#### **1.4 Estructuras nerviosas y neurotransmisores responsables de las fases del ciclo vigilia-sueño**

La experimentación animal ha permitido, mediante técnicas neuroanatómicas de lesión y estimulación, identificar regiones cerebrales y sistemas neuronales implicados en la generación y mantenimiento de cada una de las fases del CVS; los estudios de neurofisiología han servido para conocer los mecanismos celulares de las neuronas responsables de la generación de los estados de vigilia y sueño; a partir de los años 60 la investigación se ha centrado, entre otras, en el papel que juegan los neurotransmisores y las neuronas que los contienen, en las fases del CVS (Jouvet 1972, Jones 1991, 1995, 2000, Reinoso-Suárez and de Andrés 1976, Steriade and Hobson 1976).

Como resultado, podemos decir que el sueño es un fenómeno activo y complejo que afecta a todo el encéfalo y que hay estructuras responsables de las manifestaciones de cada una de las fases del CVS tanto en regiones prosencefálicas, como del tronco del encéfalo. Estas regiones están interconectadas formando una extensa y compleja red neuronal que utiliza diferentes neurotransmisores y en la que se establecen relaciones excitadoras y/o inhibitorias asimismo muy complejas (Figura 1.1).

##### ***1.4.1 Vigilia. La vigilia se caracteriza por un EEG activado y un estado consciente.***

Como ya mencionamos anteriormente, la integridad del sistema reticular ascendente de activación es fundamental para generar y mantener el estado de vigilia y la sincronización del EEG (Moruzzi and Magoun 1949). Las neuronas que originan el sistema reticular ascendente de activación se localizan en múltiples estructuras de la formación reticular del tronco del encéfalo (la formación reticular oral del puente, el complejo del locus coeruleus, los núcleos rostrales del rafe, el tegmento pontino dorsal, la formación reticular mesencefálica, el área tegmental ventral de Tsai, el hipotálamo posterolateral) que reciben, a través de colaterales, impulsos sensoriales y viscerales para originar largos axones ascendentes que alcanzan el prosencéfalo basal por una vía ventral que camina a través del subtálamo, hipotálamo y tálamo ventral. Junto con las proyecciones tálamo-corticales, procedentes de los núcleos específicos del tálamo, la proyección desde el prosencéfalo basal a la corteza cerebral produce una activación de las neuronas corticales y un EEG sincronizado; estructuras como los núcleos rostrales

del rafe y el locus coeruleus, que además proyectan directamente a la corteza cerebral, contribuyen a esta activación del EEG (Starzl et al 1951, Jones 1975, Nauta and Kuypers 1958, Scheibel and Scheibel 1958, Reinoso-Suárez 1960, 1961a, 1963).

La experimentación con animales ha corroborado esta hipótesis. Las lesiones de la formación reticular que no implican a las vías sensoriales producen una pérdida de la activación cortical que es mas acentuada cuando la lesión está localizada en la parte mas rostral de la formación reticular del puente y del hipotálamo posterior (Moruzzi and Magoun 1949, Lindsley et al 1950, Moruzzi 1972). Otros estudios experimentales han demostrado la implicación del hipotálamo posterolateral en el mantenimiento de la vigilia (Reinoso-Suárez 1960, 1961a, 1997, Lin et al 1989); en los animales a los que se les produce una ablación del tálamo todavía se puede obtener una desincronización cortical estimulando la formación reticular mesencefálica, por lo que esta activación es debida a la acción de neuronas situadas en hipotálamo posterior, subtálamo y prosencéfalo basal (núcleo basal magnocelular de Meynert, núcleos de la banda diagonal y septum), cuyas fibras siguen la ruta subtalámica y alcanzan toda la corteza cerebral (Kievit and Kuypers 1975).

Los experimentos neurofisiológicos de registros unitarios han demostrado que las neuronas de la formación reticular mesencefálica que proyectan a prosencéfalo basal tienen una tasa de frecuencia de descarga espontánea directamente relacionada con la activación cortical. También las neuronas que están en el trayecto de la vía subtalámica, a través del hipotálamo posterolateral y el prosencéfalo basal, tienen mayor frecuencia de descarga durante la vigilia que durante el sueño lento (Steriade 1981, Kasamatsu 1969, Manohar et al 1972, McGinty et al 1974, Steriade and Hobson 1976, Detari et al 1984, Szymusiak and McGinty 1986).

La mayoría de las neuronas origen del sistema reticular ascendente de activación utilizan como neurotransmisor el glutamato, el neurotransmisor excitatorio por excelencia, reconocido como fundamental para la activación cerebral durante la vigilia (Jones 1995); sin embargo, una contribución muy importante de este sistema proviene de grupos neuronales localizados en el tegmento pontino dorsal, principalmente el núcleo del tegmento pedunculopontino y el núcleo del tegmento laterodorsal, que utilizan como neurotransmisor la acetil-colina, un neurotransmisor que se sabe es esencial para la activación cortical durante la vigilia (Jouvet 1972, Jones 1993). A esto hay que añadir las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus, las histaminérgicas del



hipotálamo posterior y las dopaminérgicas del área tegmental ventral de Tsai, que proyectan de manera difusa a toda la corteza cerebral, además de a otras regiones prosencefálicas, que estimulan y mantienen la activación cortical (Steinbusch and Mulder 1984, Jones and Yang 1985, Jones 2000). El sistema de proyección tálamo-cortical también es glutamatérgico, pero estructuras del prosencéfalo basal, tales como el núcleo basal magnocelular de Maynert, los núcleos de la banda diagonal de Broca, y los núcleos septales utilizan como neurotransmisor la acetil-colina y proyectan también a toda la corteza aunque de manera difusa. Hay que tener también en cuenta que en muchas neuronas de este sistema reticular ascendente de activación co-localizan con los neurotransmisores otros agentes químicos, como la sustancia P, la neurotensina o el péptido vaso-intestinal, que sirven para aumentar o prolongar sus influencias excitatorias (Jones 2000).

***1.4.2. Sueño no-REM. El sueño no-REM se caracteriza por la presencia en el EEG de husos de sueño y ondas de alto voltaje y baja frecuencia***

Los experimentos de transección en el gato llevados a cabo por el grupo de Moruzzi ya indicaban que hay estructuras encefálicas que inducen sueño activamente: puesto que las transecciones realizadas por detrás de la formación reticular oral del puente tienen como resultado que el animal entra en un insomnio permanente, deben haber un área que genera sueño localizada en la parte caudal del tronco del encéfalo (Battini et al 1959a, 1959b). En efecto, la sincronización cortical se puede provocar en un animal despierto cuando se estimula eléctricamente con baja frecuencia la formación reticular bulbar y en concreto en zonas cercanas al núcleo del tracto solitario (Magnes et al 1961); del mismo modo, la lesión de estas zonas así como la de los dos tercios rostrales del tegmento pontino caudal produce desincronización del EEG (Bonvallet et al 1954, Camacho-Evangelista and Reinoso-Suárez 1964). Estos experimentos demuestran que en la parte caudal del tronco del encéfalo hay poblaciones neuronales, bien dispersas, bien formando estructuras, cuya actividad produce sueño.

Desde los trabajos de Bremer en la preparación *cerveau isolé* (Bremer 1935) se deduce que también hay estructuras en el prosencéfalo que produce sincronización del EEG, ya que aparecen ondas lentas corticales en ausencia de la influencia del sistema reticular ascendente de activación. Ya los primeros estudios de estimulación eléctrica llevados a cabo por Hess habían demostrado que la estimulación del hipotálamo anterior

y prosencéfalo basal en el gato producía sueño de ondas lentas (Hess 1931). La epidemia de gripe de 1918 fue especialmente virulenta; en muchos individuos la consecuencia fue una infección cerebral que produjo un síndrome llamado *encefalitis letárgica*, pues los pacientes afectados eran incapaces de mantener el estado de vigilia; sin embargo, en algunos pacientes, el insomnio era el síntoma predominante y se pudo comprobar que en estos últimos pacientes las lesiones producidas por el virus estaban centradas en el hipotálamo anterior (von Economo 1931). Las transecciones experimentales entre el hipotálamo anterior y posterior llevadas a cabo en la rata, produjeron un aumento enorme de la vigilia en el animal; este dato demuestra la existencia un centro hipnogénico en el hipotálamo anterior y región preóptica que podría tener un efecto inhibitorio sobre el centro vigilantígeno del hipotálamo posterior y el sistema reticular ascendente de activación (Nauta 1946).

Los estudios de registro unitario han demostrado que en el prosencéfalo basal de la rata hay dos poblaciones neuronales, que descargan rítmicamente durante el sueño lento, pero que se comportan eléctricamente de manera distinta cuando se activa el EEG (Núñez 1996). De estos datos se puede deducir que en el prosencéfalo basal hay neuronas directamente implicadas en los mecanismos de sincronización cortical y neuronas que pueden inhibir a las estructuras activadoras del tronco del encéfalo y del hipotálamo posterior (Reinoso-Suárez 1999).

La estimulación eléctrica de la región preóptica y prosencéfalo basal en el gato, produce sincronización del EEG y el animal manifiesta una conducta de sueño (Serman and Clemente 1962, Siegel and Wang 1974), mientras que lesiones amplias que afectan a estas zonas resultan en una disminución, o incluso desaparición, del sueño además de una desorganización del CVS (McGinty and Serman 1968, Jones 2005a, McGinty and Szymusiack 2005). Por lo tanto, además de la parte caudal del tronco del encéfalo, la región preóptica, el prosencéfalo basal y el hipotálamo anterior tienen una clara implicación en la generación de sueño lento.

En el prosencéfalo basal, además de neuronas colinérgicas, se han descrito neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas (Gritti et al 1998, Manns et al 2001). En el hipotálamo existen muchos tipos neuronales que expresan diferentes neurotransmisores como histamina, GABA, factor liberador de corticotropina (CRH), hipocretina (orexina), hormona concentradora de melanina, tiroxina hidroxilasa y glutamato

(Swanson and Sawchenko 1983, Bittencourt et al 1992, De Lecea et al 1998, Nambu et al 1999, Abranhamson and Moore 2001).

Otras estructuras prosencefálicas están también implicadas en la generación de sueño lento. Las ablaciones crónicas de la corteza y del estriado, o lesiones parciales de la neocorteza o del núcleo caudado, produjeron una marcada disminución del sueño lento (Jouvet 1962, Villablanca and Marcus 1972, Villablanca et al 1976); por otra parte, la estimulación del núcleo caudado y la corteza orbitofrontal produjeron sincronización cortical y conducta de sueño (Penaloza-Rojas et al 1964) indicando que tanto la corteza cerebral como los ganglios basales juegan un papel importante en el desencadenamiento y mantenimiento del sueño lento.

No solamente el hipotálamo anterior y el prosencéfalo basal juegan un papel importante en la generación de sueño lento, sino que también los núcleos del tálamo están implicados en la sincronización del EEG, característica del sueño de ondas lentas (Spreafico et al 1990, Reinoso-Suárez 1999). La estimulación con baja frecuencia de los núcleos intralaminares del tálamo produce en el EEG unas ondas semejantes a los husos de sueño típicos de la fase de somnolencia; la respuesta a esta estimulación, de larga latencia y distribución cortical muy amplia, aumenta al repetir el estímulo; son las llamadas respuestas de reclutamiento y representan un sistema difuso de proyección tálamo-cortical (Morison and Dempsey 1942). La lesión del tálamo en general, del núcleo reticular del tálamo en particular y de la sustancia blanca interrumpiendo las proyecciones tálamo-corticales, produce la abolición de las respuestas de reclutamiento y de los husos de sueño. Desde estos trabajos experimentales llevados a cabo en el gato, el núcleo reticular del tálamo se considera la estructura responsable de la generación de los husos de sueño que aparecen durante el sueño de ondas lentas, y actuaría como un marcapasos que a través de sus proyecciones talámicas impondría un ritmo a las neuronas talámicas que proyectan a la corteza cerebral (Villablanca 1974, Deschênes et al 1985, Steriade et al 1987). Puesto que el núcleo reticular del tálamo no proyecta a la corteza, el mecanismo de actuación sería el siguiente: las fibras tálamo-corticales que dejan colaterales en el núcleo reticular del tálamo cuando lo atraviesan, mandan información desde este núcleo a los núcleos paralaminares del tálamo, que a su vez proyectan a la capa I de la corteza produciendo este efecto sincronizador (Reinoso-Suárez 1999).

También se ha demostrado que determinados núcleos del tálamo son elementos importantes en la generación del sueño lento; las lesiones químicas experimentales en el núcleo dorsomedial del tálamo provocan una disminución del sueño de ondas lentas (Marini et al 1990). Estos hallazgos se han podido corroborar además con datos clínicos: el *insomnio familiar fatal* es una terrible enfermedad hereditaria, descubierta recientemente, que se caracteriza porque los pacientes permanecen en una vigilia constante que les conduce a la muerte en un periodo corto de tiempo; en los casos en que se ha tenido acceso al material autopsiado de estos pacientes, se ha encontrado como hallazgo neuropatológico una degeneración del núcleo dorsomedial y de los núcleos anteriores del tálamo (Lugaresi et al 1990).

Los estudios de inmunocitoquímica han demostrado que todas las neuronas del núcleo reticular del tálamo son GABAérgicas (Jones 1975, Yen et al 1985, Arcelli et al 1997, Steriade et al 1997); aunque en otros núcleos talámicos predominan las neuronas glutamatérgicas, también se han descrito neuronas GABAérgicas en los núcleos talámicos dorsales, que en gatos y primates representan hasta un 25-30% de las neuronas, si bien este porcentaje es menor en otros núcleos talámicos (Steriade et al 1997).

***1.4.3 Sueño REM. El sueño REM es la fase mas compleja, caracterizada por sincronización del EEG, atonía muscular, movimientos oculares rápidos, y PGOs.***

Todos los autores están de acuerdo en que el tegmento pontino es necesario para la generación del sueño REM con todas sus características (Jones y Yang 1985, Siegel 2000): sincronización el EEG, atonía, movimientos oculares rápidos y PGOs. Ya mencionamos anteriormente que después de la transección intercolicular realizada en el gato (*cerveau isolé*), el EEG cortical presenta espontáneamente ondas tanto de alto como de bajo voltaje (Bremer 1935) pero no aparecen PGOs ni movimientos oculares característicos del sueño REM; sin embargo, todos estos signos sí se pueden registrar en la parte caudal a la transección, es decir, en el animal descerebrado (Jouvet 1962). Por otra parte, las transecciones al nivel medular C1 no impiden que aparezcan las características del sueño REM en los niveles rostrales a la transección (Siegel 2000). Se puede concluir que las estructuras rostrales al mesencéfalo no son necesarias para desencadenar el sueño REM, si no que son las estructuras caudales al mesencéfalo y rostrales a la médula espinal las necesarias para generar esta fase del sueño.

Mediante diferentes tipos de trabajos experimentales se han podido precisar que en el tegmento pontino están localizadas las estructuras responsables de cada una de las manifestaciones características del sueño REM (Jones 1985, 1991, Sakai 1980, Reinoso-Suárez et al 1994, 1999, 2001, Siegel 2000).

En la desincronización del EEG intervienen las células colinérgicas del núcleo del tegmento pedunculopontino y la formación reticular ponto-mesencefálica, es decir, estructuras que forman parte del sistema reticular ascendente de activación. Las lesiones clásicas de la formación reticular ya habían mostrado la necesidad de la integridad de este sistema para producir la activación del EEG, aunque estudios mas recientes también lo confirman (Moruzzi and Magoun 1949, Jones 1979). Los registros unitarios de neuronas situadas en la parte central de la formación reticular del puente en el gato, muestran que estas células presentan una tasa de descarga muy alta durante el sueño paradójico y que están silentes o con baja tasa de descarga durante el sueño lento (Hobson et al 1974); de la misma manera, la estimulación química de esta misma región del tegmento pontino con agentes colinérgicos produce un aumento espectacular de sueño paradójico (Baghdoyan et al 1984a, 1984b, Reinoso-Suárez et al 1990, 1994, Garzón et al 1998). Estos últimos hallazgos confirma el papel esencia de la acetil-colina en la desincronización cortical ya sea durante el sueño paradójico o durante la vigilia (Jones 1993).

Una vez mas los experimentos de lesión han permitido demostrar cuales son las estructuras responsables de la atonía muscular durante el sueño paradójico. Lesiones muy concretas que tienen como resultado que el animal presente todas las características del sueño paradójico excepto la atonía muscular (lo que se conoce como el síndrome de sueño paradójico sin atonía), han permitido relacionar la atonía con el tegmento pontino dorsolateral (especialmente en regiones situadas alrededor del locus coeruleus, que se corresponden con los núcleos llamados locus coeruleus  $\alpha$  y pericoeruleus) y el núcleo reticular bulbar magnocelular (Sakai 1980, Hendricks et al 1982, Lai and Siegel 1988, Schenkel and Siegel 1989). Estos hallazgos se corroboran con los experimentos de estimulación química; la inyección de agentes colinérgicos y glutamatérgicos en el tegmento pontino dorsal produce también atonía (Baghdoyan et al 1984b, Lai and Siegel 1988, Reinoso-Suárez et al 1990, 1994). También la inyección de glutamato en el núcleo reticular bulbar magnocelular induce atonía (Lai and Siegel 1988), sin embargo la estimulación colinérgica en esta región bulbar no es efectiva para inducir la pérdida del tono muscular (Baghdoyan et al 1984a). De estos hallazgos se deduce que es la

región del tegmento pontino dorsal la que está implicada en la generación de la atonía, actúa a través de conexiones sobre el núcleo reticular bulbar magnocelular, el cual a través del haz retículo-espinal inhibe activamente las motoneuronas espinales provocando su hiperpolarización y utilizando como neurotransmisor la glicina (Kohyama et al 1998).

Las PGOs son una de las manifestaciones físicas mas características del sueño paradójico; puesto que estas ondas no se pueden detectar en el hombre y son difíciles de registrar en la rata, los datos que se conocen acerca de las estructuras implicadas en su generación, se han obtenido de los estudios realizados en el gato. Después de una transección a nivel del núcleo abducens las PGOs se pueden registrar con un patrón relativamente normal en el prosencéfalo rostral a la transección; sin embargo cuando la transección se realiza unos pocos milímetros mas rostralmente, las ondas PGOs desaparecen por completo (Siegel et al 1984, Laurent et al 1974). Se ha podido precisar que la estructura responsable de generar las ondas PGO está situada alrededor del pedúnculo cerebeloso superior (brachium conjunctivum) y se corresponde a los núcleos parabraquiales, y los núcleos del tegmento pedunculopontino y laterodorsal donde hay neuronas colinérgicas dispersas o agrupadas en el núcleo (Saito et al 1977, McCarley et al 1978, Sakai 1980, Steriade et al 1990); cuando una lesión está restringida a esta zona se produce sueño REM sin PGOs (Shouse and Siegel 1992), pero éstas pueden aparecer en ausencia de sueño paradójico cuando se realiza una estimulación colinérgica en el tegmento pontino (Baghdoyan et al 1984b, Reinoso-Suárez et al 1990, 1994). Las neuronas serotoninérgicas del sistema de los núcleos del rafe proyectan sobre estas neuronas colinérgicas mesopontinas (Rodrigo-Angulo et al 2000) y actúan inhibiendo la aparición de las PGOs; la lesión del núcleo dorsal del rafe, o de zonas laterales adyacentes, produce un marcado aumento de la actividad PGO (Simon et al 1973), mientras que los estudios *in vitro* han demostrado que la serotonina hiperpolariza y bloquea la actividad de esas células colinérgicas generadoras de PGOs (Luebke et al 1992). Esta acción es importante en la transición de sueño lento a sueño paradójico, pues al cesar la actividad de las células serotoninérgicas se permite la descarga de las células colinérgicas generadoras de PGOs.

La otra característica física del sueño paradójico son los movimientos oculares rápidos, generalmente asociados con las PGOs. Mediante lesiones electrolíticas localizadas se ha podido determinar que las estructuras anatómicas implicadas en la generación de los movimientos oculares rápidos son la formación reticular pontina



medial, el núcleo periabducens y el núcleo prepósito del hipoglosa, que con su relación con los núcleos del VI par craneal generarían estos movimientos (Sakai 1985, Jones 1991, Reinoso-Suárez 2005).

Por lo tanto, los resultados indican que la región mas caudal del mesencéfalo junto con el núcleo reticular oral del puente son las estructuras necesarias y suficientes para generar y mantener sueño paradójico con todas sus características. Este concepto es todavía válido hoy en día (Luppi et al 2007).

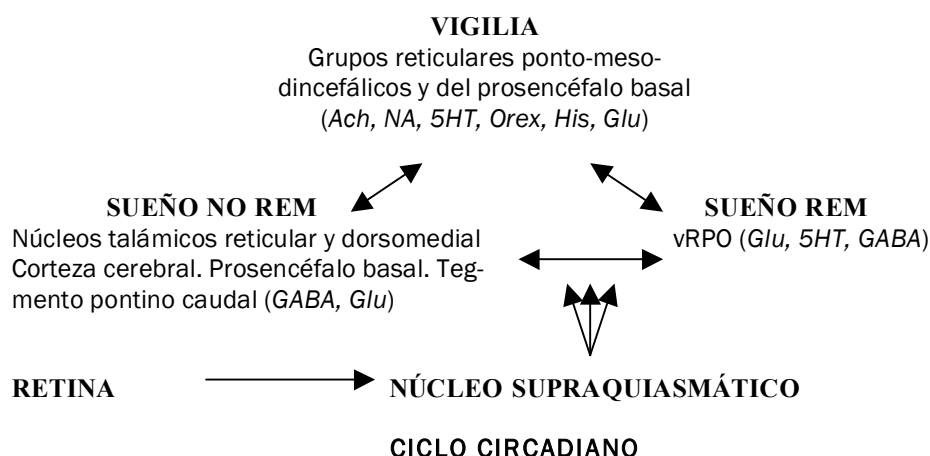


Figura 1.1- Estructuras nerviosas y neurotransmisores implicados en las fases del CVS del gato (Basada en Reinoso-Suárez 2005). Ach: acetil-colina, NA: noradrenalina, 5HT: serotonina, Orex: orexina, His: histamina, Glu: glutamato

### 1.5 Generación y mantenimiento del sueño REM. El vRPO

Una vez que quedaron establecidas qué estructuras eran responsables de cada una de las características peculiares del sueño paradójico (en lo que prácticamente todos los autores están de acuerdo), surge la pregunta de cuál es la estructura capaz de poner en marcha simultáneamente la red neuronal responsable de inducir el sueño paradójico con todas sus características bioeléctricas y de comportamiento, y cuáles son los mecanismos y sustratos químicos implicados.

Los primeros intentos de atribuir a una estructura y un neurotransmisor determinados al desencadenamiento del sueño paradójico se deben al grupo de Jouvet. Las lesiones electrolíticas bilaterales que estos investigadores realizaban destruyendo toda la región del locus coeruleus, donde están localizadas las neuronas noradrenérgicas, producían la abolición del sueño paradójico (Jouvet and Delorme 1965, Jouvet 1972). Con estos datos, Jouvet enunció su teoría monoaminérgica del

sueño, según la cual, la región del locus coeruleus y su neurotransmisor, la noradrenalina, eran los responsables del sueño paradójico (Jouvet 1972).

Sin embargo, otros datos vinieron a desechar esta teoría: las lesiones restringidas de neuronas noradrenérgicas de la misma región no producían el mismo efecto, y la inhibición de la síntesis de catecolaminas producía, en cambio, un estado de hipersomnia caracterizado por un aumento tanto del sueño lento como del sueño paradójico (Henley and Morrison 1974, Jones et al 1977, Jacobs and Jones 1978).

A esto se vinieron a añadir las evidencias obtenidas por los estudios electrofisiológicos realizados por el grupo de Hobson: las células noradrenérgicas del locus coeruleus y las serotoninérgicas de los núcleos del rafe empezaban a decrecer su tasa de descarga durante el sueño lento para cesar su actividad y quedar totalmente silentes durante el sueño paradójico; por el contrario, las neuronas de la formación reticular pontina gigantocelular, que se sabía contienen concentraciones moderadas de acetil-colinesterasa y deben ser colinérgicas o colinoceptivas (Papp and Bozsik 1966), aumentaban su tasa de descarga hasta el máximo nivel durante el sueño paradójico (McCarley and Hobson 1971, McGinty et al 1974, Hobson et al 1975). Por lo tanto, y basado en la descarga selectiva de estas neuronas, el grupo de Hobson propuso una hipótesis, el modelo de interacción recíproca, que explicaba la generación del sueño paradójico por la interacción y la actividad oscilatoria recíproca entre las neuronas colinérgicas o colinoceptivas de la formación reticular pontina gigantocelular, y las noradrenérgicas y serotoninérgicas del locus coeruleus y de los núcleos del rafe; las neuronas colinérgicas de la formación reticular pontina gigantocelular tendrían un papel ejecutivo en la generación de sueño paradójico, mientras que las del locus coeruleus y núcleos del rafe tendrían una acción permisiva, pues cuando las células noradrenérgicas y serotoninérgicas dejaran de actuar se podría manifestar el sueño paradójico (Hobson et al 1975).

Este modelo de interacción recíproca y atribuir la responsabilidad de la génesis de sueño paradójico exclusivamente a las neuronas de la formación reticular gigantocelular no se ha podido mantener. Las neuronas de la formación reticular gigantocelular no son colinérgicas si no colinoceptivas, aunque tienen gran actividad durante el sueño paradójico también la tienen durante la vigilia, y cuando se destruyen selectivamente con citotóxicos específicos, como el ácido kaínico o el iboténico, el sueño paradójico se mantiene sin ninguna alteración (Siegel and McGinty 1977, Siegel 1979, Sastre et al 1981, Drucker-Colin and Pedraza 1983, Suzuki et al 1989).

Sin embargo, durante los últimos 30 años, los resultados de la investigación mediante técnicas de estimulación colinérgica han permitido esclarecer que la acetilcolina es el principal neurotransmisor implicado en la organización del sueño paradójico en el tegmento pontino (Baghdoyan et al 1984a, Reinoso-Suárez et al 2001, Pace-Schott and Hobson 2002). La posible mediación de la acetilcolina en la generación del sueño paradójico ya la habían sugerido distintos autores en trabajos pioneros (Jouvet 1962, 1972, Cordeau et al 1963, Hernández-Peón 1965). En estos trabajos la inyección local o depósitos de cristales de acetilcolina en el tegmento pontino producían momentáneamente sueño paradójico. La administración directa de acetilcolina en el tronco del encéfalo no produce demasiado efecto pues las colinesterasas presentes en la zona la metabolizan inmediatamente. Por esta razón muchos experimentos de estimulación colinérgica se han llevado a cabo mediante la administración de carbacol (carbamil-amida), un agente colinomimético de molécula muy semejante a la acetilcolina y resistente a las colinesterasas.

En los últimos años se han realizado multitud de experimentos por medio de inyecciones de carbacol en diferentes localizaciones del tegmento pontino tratando de concretar la estructura responsable de la generación y mantenimiento del sueño REM (Jouvet 1972, Baghdoyan et al 1984a, 1987, 1993, Vanni-Mercier et al 1989, Yamamoto et al 1990, Reinoso-Suárez et al 1994, Garzón et al 1998). Cuando se realizan en el gato inyecciones de un volumen de 500 nl de carbacol en el puente, se produce una espectacular caída del animal en sueño paradójico, acompañada de una abolición total del sueño lento. Utilizando esta metodología, distintos grupos de investigación han señalado que el lugar de inducción de sueño paradójico causado por el carbacol está situado dorsal y lateral en el tegmento pontino oral y especialmente en el locus coeruleus  $\alpha$  y pericoeruleus (Baghdoyan et al 1984a, 1987, Vanni-Mercier et al 1989, Yamamoto et al 1990, Shiromani et al 1992). También se ha descrito en la rata estructuras cercanas al locus coeruleus, en concreto en núcleo denominado sublaterodorsal, como generadoras de sueño paradójico por estimulación con carbacol y otros neurotransmisores (Boissard et al 2002). Sin embargo, otros autores han demostrado que estimulando, por el mismo procedimiento, la región dorsal y lateral del tegmento pontino oral se produce un estado de vigilia acompañado de atonía muscular (van Dongen et al 1978, Hayes et al 1984, Reinoso-Suárez et al 1990, 1994).

En nuestro Departamento llevamos 30 años trabajando en los mecanismos de generación de sueño paradójico en el gato. Los experimentos realizados por el grupo de

Reinoso-Suárez han permitido esclarecer cuál es el lugar del tegmento pontino responsable de la generación y mantenimiento del sueño paradójico (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994, 1999, 2001, Reinoso-Suárez 1998, 2005). Con este fin se realizaron una serie de experimentos en los que se lesionaba por medio de diatermocoagulación pequeñas zonas del tegmento pontino; los resultados mostraron las lesiones que quedaban situadas alrededor del locus coeruleus, en locus coeruleus  $\alpha$  y pericoeruleus, o en el tegmento pontino dorsal en general, producían un aumento de sueño paradójico; por el contrario, las lesiones localizadas en la parte ventral del núcleo reticular oral del puente tenían como única manifestación significativa una disminución del sueño paradójico (Gutiérrez-Rivas et al 1978, Gutiérrez-Rivas y de Andrés 1980, De Andrés et al 1985, Caballero and de Andrés 1986).

Con base en estos hechos, se replanteó estudiar el efecto que sobre el CVS ejerce el carbacol en el tegmento pontino: las inyecciones de 500 nl de carbacol que realizaban otros grupos, son un volumen enorme y la difusión de la droga se extiende a todo el tegmento pontino; por otra parte, se realizaban múltiples inyecciones en un mismo animal y cada inyección produce una cicatriz que modifica el lugar de inyección.

Con objeto de precisar el lugar de inyección y limitar la difusión de la droga, realizamos experimentos de registro de sueño en el gato, haciendo una sola inyección en cada animal y limitando el volumen de la inyección de la solución de carbacol a 20-30 nl. Cuando las inyecciones estaban localizadas en regiones dorsales, locus coeruleus  $\alpha$  y pericoeruleus, se produjo un aumento de la vigilia, que llegó a ocupar el 95% del registro durante las primeras horas después de la inyección, una desaparición total del sueño lento, y atonía muscular con una latencia de 2 minutos; solo a partir de la cuarta hora posterior a la inyección se pudo registrar sueño paradójico, con un porcentaje superior al del animal control (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994). Sin embargo, las inyecciones situadas en regiones ventrales produjeron una caída inmediata del animal (latencia media de 1 minuto) en sueño paradójico, con todas sus manifestaciones bioeléctricas y de comportamiento, que duraba largos periodos de tiempo alternados con breves periodos de despertar; estas inyecciones produjeron también abolición del sueño lento, pero a partir de las 5 horas se producía un aumento de sueño paradójico que alcanzaba porcentajes semejantes a los producidos tras las inyecciones situadas en la región dorsal. Estos hallazgos, permitieron concluir que la región ventral del núcleo reticular oral del puente (vRPO) es el sitio mas eficaz para producir sueño paradójico

con todas sus manifestaciones (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994, 1999, 2001, Garzón et al 1998, Manquillo et al 1999).

Para considerar que el vRPO es responsable de la generación del sueño paradójico, es necesario conocer sus conexiones anatómicas. Los estudios de conectividad llevados a cabo por el grupo de Reinoso-Suárez han consistido en inyectar en el vRPO una mezcla de carbacol con un trazador anterógrado y retrógrado, la peroxidasa de rabanilla picante conjugada con aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA); este método permite no solo identificar con precisión el área estimulada, si no también el estudio de sus patrones de conexión. Los resultados han permitido demostrar la existencia de conexiones recíprocas del vRPO con las estructuras responsables de cada una de las manifestaciones características del sueño paradójico y con las estructuras responsables de las otras fases del CVS; así, el vRPO puede inducir al mismo tiempo la aparición de las características bioeléctricas del sueño paradójico, y puede también permitir una secuencia de las diferentes fases del CVS (Figura 1.2) (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994, 1999, 2001).

En la Figura 1.2 se muestran las principales conexiones, el vRPO está conectado con el núcleo del tegmento pedunculopontino y la formación reticular pontomesencefálica, responsables de la activación del EEG; con el tegmento pontino dorsolateral y el núcleo reticular bulbar magnocelular, responsables principales de la atonía muscular; con el tegmento pontino medial, núcleo abducens, para-abducens y prepósito del hipogloso, responsables de los movimientos oculares rápidos, además de con otras estructuras relacionadas con la regulación de los movimientos oculares, tales como el campo ocular frontal de la corteza cerebral, el sector dorsolateral del núcleo dorsomedial del tálamo, la zona incerta, la región pretectal, el colículo superior y el núcleo fastigio del cerebelo; y, con las neuronas colinérgicas del tegmento mesopontino incluyendo las del núcleo del tegmento pedunculopontino, a través de las cuales se generan las PGOs (Reinoso-Suárez et al 1994, Reinoso-Suárez 1998, 2005, Sánchez-Valle et al 2000, Rodrigo-Angulo et al 2000, 2005). También los hallazgos demuestran (Figura 1.2) una estrecha conexión del vRPO con la formación reticular oral del puente y mesopontina dorsolateral, la formación reticular mesencefálica y el hipotálamo dorsolateral, responsables de la vigilia; con el núcleo reticular del tálamo, generador de los husos de sueño; y, con la corteza prefrontal y núcleo dorsomedial del tálamo, implicados en el sueño lento (Reinoso-Suárez et al 1999, 2001). Estas interconexiones utilizan una gran variedad de neurotransmisores y pueden proporcionar las bases

anatómicas que expliquen la alternancia de las distintas fases del CVS en un equilibrio de excitación-inhibición (Moruzzi 1972, Reinoso-Suárez 1998, 2005, Reinoso-Suárez et al 2001, Saper et al 2001, Steriade et al 1987).

Los límites del vRPO han podido ser corroborados por los hallazgos de otros autores obtenidos tanto en el gato como en la rata (Baghdoyan et al 1993, Leonard and Lydic 1997, Garzón et al 1998, Horner and Kubin 1999, Kohlmeirer et al 2002, Fenik and Kubin 2008). Además, el vRPO o una región equivalente en la rata, es el lugar mas efectivo para producir sueño paradójico mediante la inyección de otros neurotransmisores (Iwakiri et al 1993, Bier and McCarley 1994, Garzón et al 1996, Kshatri et al 1998, Manquillo 2000, Kohlmeir et al 2002, Fenik and Kubin 2008).

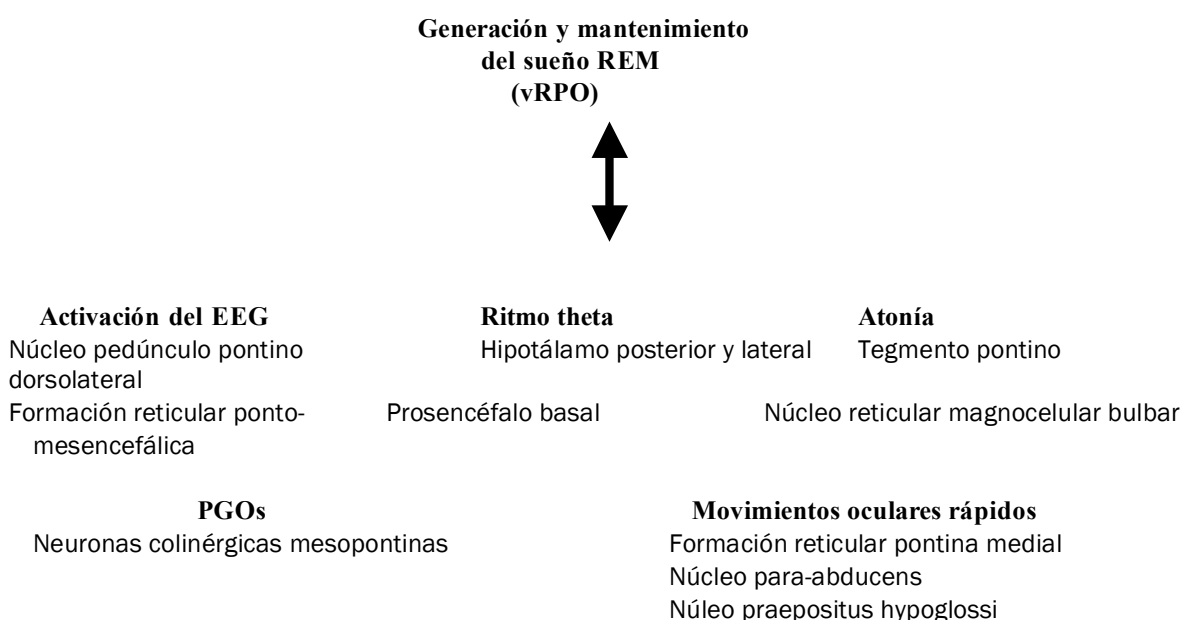


Figura 1.2- Esquema de las conexiones recíprocas (flecha de doble sentido) del vRPO con los sistemas responsables de los diferentes signos del sueño REM. El vRPO también tiene abundantes conexiones recíprocas con el vRPO contralateral, núcleos talámicos parafascicular y habenuar lateral, zona incerta, núcleos pretectales, colículo superior, sustancia gris central, cerebelo y médula espinal. Además, la corteza frontal y la del surco ectosilviano anterior son las cortezas que más proyectan al vRPO (Modificado de Reinoso-Suárez et al 2001)

El registro de la actividad eléctrica y las propiedades sinápticas de las neuronas del vRPO junto con sus características morfológicas, se han estudiado *in vivo* en el gato anestesiado con uretano. Se ha podido caracterizar dos tipos de neuronas: neuronas tipo I de soma elipsoidal, árboles dendríticos gruesos y axón de proyección, con descarga espontánea no rítmica, y, neuronas tipo II de somas poligonales, dendritas radiales y axón con terminales arborizadas localmente, que presentan una descarga espontánea

rítmica (Núñez et al 2002). Neuronas con características morfológicas y funcionales semejantes se han podido detectar en la región equivalente al vRPO en la rata, mediante registros intracelulares *in vitro* (Núñez et al 1997, 1998, Kohlmeier et al 2002).

Por lo tanto, estos experimentos de lesión, estimulación química, registro y conectividad han venido a demostrar que el vRPO en el gato es el punto nodal del tegmento pontino responsable de generar y mantener toda la fenomenología del sueño paradójico, provocando que otros grupos celulares produzcan cada uno de los signos que definen este estado de sueño.

### 1.6 La implicación de los sistemas GABAérgicos en el sueño

Durante mucho tiempo, y basado sobre todo en datos clínicos, se ha considerado que el ácido gamma-amino-butírico (GABA), el neurotransmisor inhibitorio más importante del cerebro, juega un papel importante en el sueño. Las benzodiazepinas, los mejores agentes sedativos o hipnóticos, actúan aumentando el efecto postsináptico del GABA en la unión de esta molécula con sus receptores mientras que el pentobarbital y otros anestésicos actúan aumentando las corrientes sinápticas que median en los receptores GABA. Por otra parte, las drogas que aumentan los niveles de GABA en el cerebro por inhibición de su catabolismo, aumentan el sueño lento (Nicoll 1978, Mendelson 1985, Scherschlicht 1985).

El GABA actúa sobre dos tipos de receptores: el receptor A (GABA<sub>A</sub>) que está directamente ligado a los canales iónicos de Cl<sup>-</sup>, y el receptor B (GABA<sub>B</sub>) que actúa a través de segundos mensajeros para modular distintos canales iónicos. Aunque estos dos tipos de receptores están generalmente asociados con la inhibición, la acción del GABA<sub>A</sub>, que está modulado por las benzodiazepinas y el pentobarbital, es muy rápida, mientras que la del GABA<sub>B</sub> es lenta y prolongada, lo que también incluye una ralentización en la liberación del neurotransmisor (Bowery 1989, Crunelli and Leresche 1991, Mody and Pearce 2004).

Las neuronas GABAérgicas, son las que contienen la enzima sintetizadora de este aminoácido, la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD); están ampliamente distribuidas por el tronco del encéfalo, el diencefalo, y el prosencéfalo y, aunque la mayoría son interneuronas locales, pueden actuar como neuronas de proyección (Mugnaini and Oertel 1985, Scherschlicht 1985). En la formación reticular del tronco del encéfalo las neuronas GABAérgicas se encuentran entremezcladas con la enorme

cantidad de neuronas y fibras de proyección glutamatérgicas del sistema reticular ascendente de activación sobre el que podrían actuar de forma inhibitoria a través de conexiones locales (Jones 1995). Las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular del tálamo son las que generan los husos tálamo-corticales; estas neuronas se hiperpolarizan y depolarizan de forma cíclica por acción del  $\text{Ca}^{++}$ , lo que tiene como consecuencia su actividad rítmica; el GABA liberado por las neuronas reticulares hiperpolariza las células tálamo-corticales que activadas de esta manera rítmica producen potenciales postsinápticos inhibitorios sincronizados que generan los husos de sueño en el EEG (Steriade and Deschênes 1984, Steriade et al 1993, Hofle et al 1997). Mezcladas con neuronas colinérgicas y, aproximadamente en una proporción del 50%, un gran número de neuronas GABAérgicas se encuentran distribuidas por el hipotálamo anterior, la región preóptica y el prosencéfalo basal; algunas dan origen a proyecciones que descienden hasta el hipotálamo posterior donde pueden tener un efecto inhibitorio sobre las neuronas del sistema de activación (Gritti et al 1993, 1994) y otras son origen de proyecciones ascendentes largas que llegan hasta la corteza (Vincent et al 1983, Fisher et al 1988, Gritti et al 1997).

Ya mencionamos que la región preóptica y el prosencéfalo basal jugaban un papel importante en el sueño, ya que su lesión producía insomnio (Jones 2005a, McGinty and Szymusiak 2005) y que sus neuronas tienen mayor tasa de descarga durante el sueño que durante la vigilia (Szymusiak and McGinty 1986, 1989, Koyama and Hayaishi 1994, Szymusiak 1995, Szymusiak et al 1998). Los trabajos realizados en rata han evidenciado que una significativa proporción de las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo basal y la región preóptica están activas durante la fase de recuperación de sueño subsiguiente a una privación de sueño, como se demuestra por la expresión de *fos*, y además tienen receptores adrenérgicos (Modirrousta et al 2004). Los estudios de registro han demostrado también que las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo basal presentan una mayor tasa de descarga asociada a una desactivación cortical y durante el sueño lento (Manns et al 2000).

Junto con neuronas colinérgicas, las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo basal y región preóptica proyectan a la corteza donde pueden ejercer una influencia directa sobre las células piramidales (Gritti et al 1997); caudalmente proyectan al hipotálamo posterior y al tronco del encéfalo, donde pueden inducir sueño al innervar neuronas de diferente naturaleza bioquímica (Jones and Cuello 1989, Gritti et al 1994, Saper et al 2001, Henny and Jones 2003, Jones 2005b).



Estudios farmacológicos realizados *in vitro* indican que la noradrenalina depolariza y excita a las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, pero hiperpolariza e inhibe a las no-colinérgicas (Fort et al 1998); de manera similar, células GABAérgicas inductoras de sueño del área preóptica ventrolateral también se hiperpolarizan e inhiben por acción de la noradrenalina (Gallopín et al 2000). Los experimentos realizados *in vivo* en los que se combina el registro con la tinción inmunocitoquímica indican que las células GABAérgicas que descargan durante la desactivación cortical contienen receptores noradrenérgicos (Manns et al 2003). Estas células son heterogéneas en cuanto a sus propiedades de descarga; hay neuronas que descargan en salvas junto con las ondas lentas corticales y se pueden activar antidrómicamente desde la corteza y hay otras que descargan de forma tónica y no se pueden activar por este mismo procedimiento (Manns et al 2000). Por tanto, las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo basal y la región preóptica activas durante el sueño, podrían estar inhibidas durante la vigilia por acción de la noradrenalina, y se desinhibirían para activarse e inducir sueño lento, cuando las células noradrenérgicas del locus coeruleus disminuyeran su tasa de descarga (Jones 2005b).

En el tálamo, las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular inhiben a las neuronas de relevo tálamo-corticales, incluso a las de los sistemas inespecíficos, para disminuir la activación cortical (Steriade et al 1994). Los patrones de descarga en salvas durante el sueño lento de estas neuronas, desatan la actividad de husos de sueño y las oscilaciones delta por medio de la acción hiperpolarizante del GABA sobre las neuronas de relevo (Jones 2005b).

En el tronco del encéfalo, las neuronas GABAérgicas también parecer estar selectivamente activas durante el sueño, y podrían inhibir a neuronas que están activas durante la vigilia en estructuras tales como la formación reticular o el locus coeruleus, donde las neuronas GABAérgicas locales expresan *fos* durante el sueño (Jones 1995, Maloney et al 1999, 2000). Las neuronas GABAérgicas de la formación reticular bulbar que proyectan a la médula espinal están activas durante el sueño paradójico y podrían, junto con las neuronas glicinérgicas, inhibir directamente a las motoneuronas espinales (Boissard et al 2002, Jones 2005b).

Como hemos visto, una enorme batería de neurotransmisores y neuromoduladores está implicada en las distintas fases del CVS y se ha podido dar una explicación convincente del funcionamiento de muchos de ellos en determinados sistemas (Reinoso-Suárez et al 2001, Jones 2005a, Reinoso-Suárez 2005, Luppi 2007). En los últimos

años, está cobrando importancia la implicación que tiene el GABA como modulador del sueño paradójico, sobre qué estructuras y por medio de qué mecanismos este neurotransmisor inhibitorio está actuando durante esta fase del sueño. Para contestar a estas preguntas se están haciendo estudios, sobre todo en rata, pero también en gato, utilizando múltiples técnicas metodológicas: registros intracelulares en rodajas (*slices*), registros *in vitro*, inyecciones y aplicaciones iontoforéticas de agonistas y antagonistas GABAérgicos, microdiálisis, y estudios con el animal libre.

Las inyecciones directas o por iontoforesis de agonistas GABAérgicos en regiones dorsales o ventrales del tegmento pontino de ratas y de gatos, han dado resultados contradictorios. La aplicación iontoforética de bicuculina o gabacina (ambos antagonistas de GABA<sub>A</sub>) en el núcleo sublaterodorsal de la rata y región del locus coeruleus, donde algunos autores localizan la zona efectiva para inducir sueño paradójico (Boissard et al 2000), produce periodos prolongados de sueño paradójico (Boissard et al 2002); este resultado se obtuvo tanto en ratas inmovilizadas como libres (Pollock and Mistlberger 2003, Sandford et al 2003, Marks et al 2003). En el gato, la inyección de bicuculina o faclofen (un antagonista de GABA<sub>B</sub>) en perilocus coeruleus produjo también, y con latencia corta, periodos prolongados de sueño paradójico; por el contrario, las inyecciones de muscimol o baclofen (agonistas GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> respectivamente) produjeron vigilia (Xi et al 1999a, 1999b, 2001a, 2001b).

El efecto del GABA sobre las neuronas del vRPO del gato y su estructura equivalente en la rata, se ha estudiado con distintas aproximaciones metodológicas. Utilizando técnicas de inmuno-oro post-inclusión combinadas con microscopía óptica y electrónica, se ha podido describir en la rata, pero sobre todo en el gato, la existencia tanto de neuronas como de fibras terminales GABAérgicas en el vRPO (Mugnaini and Oertel 1985, Ford et al 1995, De la Roza and Reinoso-Suárez 2000, 2003, 2006, De la Roza et al 2004). Un cuidadoso estudio de recuento ha demostrado que el 30% de las terminales nerviosas sobre las neuronas del vRPO del gato son GABAérgicas y que la mayor parte de estas terminales hacen contacto sináptico sobre dendritas, solo un 6.8% hace sinapsis sobre el soma; es interesante comprobar que, sobre una misma dendrita, junto con estas terminales GABAérgicas simétricas se observan con frecuencia terminales no-GABAérgicas asimétricas, que posiblemente utilizan un neurotransmisor excitador (De la Roza and Reinoso-Suárez 2006). Por otra parte, la densidad del producto inmuno-oro de las terminales GABAérgicas varía considerablemente, lo que hace suponer que hay diferencias significativas en su producción y consumo de GABA;

esto sugiere la existencia de diferentes tipos de terminales GABAérgicas sobre las neuronas del vRPO, que podrían tener diferentes orígenes y funciones fisiológicas (De la Roza et al 2004).

La presencia de transportadores funcionales de GABA en el vRPO se ha podido confirmar mediante experimentos de microdiálisis realizados *in vitro* en la rata (Watson et al 2007). El registro intracelular de las neuronas de la región del vRPO en *slices* de rata para ver su comportamiento ante distintos neurotransmisores, indica que estas neuronas se hiperpolarizan cuando se añade GABA o serotonina a la cámara de registro, mientras que el efecto que tienen la acetil-colina, la muscarina o el glutamato sobre estas neuronas es la depolarización (Núñez et al 1997, 1998). El efecto del GABA sobre las neuronas del vRPO en el gato, o de su región equivalente en la rata, se ha hecho también en animales libres *in vivo*. En el gato, la microinyección local de GABA o muscimol produce una disminución del sueño paradójico y aumento de la vigilia, mientras que la inyección de bicuculina produce aumento de sueño paradójico (Xi et al 1999a, 1999b, 2001a, 2001b, Manquillo 2000). Corroborando estos datos, se ha demostrado, también en el gato libre sin anestesiarse, que el muscimol bloquea el efecto de inyección de carbacol en el núcleo reticular oral del puente, que normalmente da lugar a la aparición de sueño paradójico con corta latencia (Xi et al 2004). Un fenómeno parecido ocurre en la rata, la inyección en el tronco del encéfalo de muscimol y bicuculina producen respectivamente disminución y aumento de sueño paradójico (Sanford et al 2003).

Queda por dilucidar cual es la localización de los somas neuronales origen de las terminales GABAérgicas que está actuando sobre las neuronas del vRPO. Hay dos posibilidades: que los somas GABAérgicos pertenezcan a interneuronas locales localizadas en el propio vRPO o en su vecindad, o, que estén localizados en estructuras distintas del tegmento pontino desde donde enviarían axones a este área. En cuanto a la primera posibilidad, hay datos anatómicos que demuestran que hay neuronas GABAérgicas distribuidas dentro y en los alrededores del núcleo reticular oral del puente (Kosaka et al 1987, Jones 1991, Ford et al 1995). En cuanto a la segunda posibilidad, también los datos anatómicos indican que existe un gran número de neuronas GABAérgicas cuyos axones pueden proyectar a largas distancias dentro del sistema nervioso central (Mugnaini and Oertel 1985, Reinoso-Suárez et al 1994, 2001, Ford et al 1995, Xi et al 1999a, 2004, De la Roza and Reinoso-Suárez 2000, 2006, Núñez et al 2002, De la Roza et al 2004).

Aunque seguramente algunas de las terminales GABAérgicas sobre las neuronas del vRPO en el gato proceden de neuronas GABAérgicas locales del tronco del encéfalo, las neuronas propias del vRPO son escasas, lo que hace pensar que la mayoría de ellas se originen en neuronas GABAérgicas pertenecientes a estructuras relacionadas con otras fases del CVS, como el prosencéfalo basal, el núcleo reticular del tálamo, el área hipotalámica anterior y/o el hipotálamo posterolateral (Jones 1975, Mugnaini and Oertel 1985, Yen et al 1985, Brashear et al 1986, Arcelli et al 1997, Gritti et al 1998, 2003, 2006, Xi et al 1999a, 1999b, Abrahamson and Moore 2001, Manns et al 2001, Rodrigo-Angulo et al 2006). La existencia de una proyección GABAérgica desde estas estructuras apoyaría la hipótesis de una inhibición específica de la actividad de la neuronas inductoras de sueño paradójico del vRPO durante las otras fases del CVS.

## *2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS*

## **2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

El vRPO forma parte de una extensa red neuronal en la que confluyen numerosas conexiones aferentes que utilizan una gran variedad de neurotransmisores, de cuya actividad resulta la generación y regulación del sueño REM.

La relación del GABA con el ciclo vigilia-sueño se puso inicialmente de manifiesto en la década de los años ochenta con el esclarecimiento de la fisiología de los husos de sueño, ya que la descarga rítmica de las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular del tálamo constituye el marcapasos de dicha actividad (Deschênes et al 1985, Steriade et al 1987). Sin embargo, la distribución de neuronas GABAérgicas es muy amplia en todo el sistema nervioso central, incluyendo corteza cerebral, prosencéfalo basal, tálamo, hipotálamo y tronco del encéfalo, de manera que diferentes estudios experimentales en animales han demostrado la implicación del GABA en el ciclo vigilia-sueño más allá de la generación de los husos de sueño, poniendo de manifiesto su relación en la regulación tanto de la vigilia como del sueño REM (Xi et al 1999a, 1999b, Manquillo 2000).

Los experimentos realizados con microscopía electrónica han descrito un componente GABAérgico en las proyecciones que se originan en el hipotálamo lateral-posterior y terminan sobre las neuronas del vRPO, sugiriendo que hay una influencia inhibitoria GABAérgica sobre este núcleo desde estructuras hipotalámicas relacionadas con la vigilia (De la Roza et al 2004). Recientemente se ha demostrado que la actividad neuronal del vRPO se encuentra significativamente controlada por neuronas GABAérgicas, estimándose que un 30% de las terminales sinápticas sobre las neuronas del vRPO tienen una reactividad positiva para el GABA (De la Roza and Reinoso-Suárez 2006). Sin embargo, no se ha descrito una proyección GABAérgica desde el núcleo reticular del tálamo y/o estructuras hipotalámicas al vRPO.

Los sistemas GABAérgicos pontinos pueden localizarse, bien en somas de interneuronas locales, bien en neuronas GABAérgicas situadas en la vecindad pero que envían axones a las zonas responsables de la generación de sueño REM. Se ha hipotetizado que este sistema GABAérgico pontino actúa como un mecanismo que desencadena el control de la generación y mantenimiento de sueño activo y vigilia. (Xi et al 1999a, 1999b, 2004). Otros datos anatómicos indican que hay un gran número de neuronas GABAérgicas cuyos axones proyectan a distancias muy largas dentro del sistema nervioso central (Mugnaini and Oertel 1985; Ford et al 1995). Es posible que

neuronas GABAérgicas de axón largo estén innervando neuronas pontinas responsables del control de la vigilia y del sueño, pero el origen de este sistema GABAérgico todavía está por dilucidar (Xi et al 1999a, 1999b).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos concretos que nos hemos propuesto llevar a cabo en este trabajo de Tesis Doctoral se dirigen a:

- ✓ Estudiar la localización de las neuronas de áreas y núcleos del prosencéfalo basal, del tálamo, del hipotálamo y del tronco del encéfalo que envían sus axones al vRPO, la zona generadora de sueño REM, en el gato.
- ✓ Especificar la distribución de las neuronas origen de las conexiones aferentes GABAérgicas al vRPO desde las estructuras mencionadas en el apartado anterior.
- ✓ Comprobar la presencia de neuronas GABAérgicas locales en el tegmento pontino que proyecten al vRPO.
- ✓ Cuantificar las proyecciones GABAérgicas y no GABAérgicas al vRPO mediante recuento neuronal.
- ✓ Concretar qué papeles específicos juegan cada una de estas proyecciones (GABAérgica y no-GABAérgica) al vRPO en la modulación del sueño REM y en la alternancia de las fases del CVS.

Para ello, utilizando el gato como animal de experimentación, hemos realizado un estudio en el que se combina la inyección en el vRPO de un trazador neuronal retrógrado, subunidad  $\beta$  de la toxina colérica conjugada con oro coloidal (CTb), con la inmunocitoquímica para la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). De esta manera, las neuronas CTb-positivas son neuronas que proyectan al vRPO y las neuronas doblemente marcadas, CTb-positivas y GAD-positivas, son las neuronas GABAérgicas que proyectan al vRPO.

Con este trabajo pretendemos hacer una aportación al conocimiento del papel que juega el prosencéfalo basal, el hipotálamo y otras estructuras diencefálicas en una función fisiológica tan importante como es el CVS y la contribución de un neurotransmisor de naturaleza primariamente inhibidora, como es el GABA, a la modulación del sueño REM, desencadenado por las neuronas del vRPO.

### *3. MATERIAL Y MÉTODOS*



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico utilizado

Este trabajo experimental se ha llevado a cabo utilizando gatos machos adultos de 3-3.5 Kg de peso. Tanto en el periodo preoperatorio, como durante la intervención quirúrgica, y en el periodo postoperatorio se han observado las normas de las European Communities Council Directives de 24 de Noviembre de 1986 sobre cuidado de animales de investigación (86/609/EEC) (RD 1201/2005 de 10 de Octubre) y las del Comité para Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Universidad Autónoma de Madrid.

Siguiendo estas normas, los gatos se obtuvieron de granjas especializadas autorizadas para la cría de estos animales con fines de investigación (Córdoba y Barcelona). A su llegada al animalario y bajo la supervisión de la Veterinario Titular, Dra. Carmen Fernández Criado, se hacía un examen físico a los animales, ya que en muchas ocasiones presentaban infecciones intestinales o de los oídos, y, cuando era necesario, se trataban con antibióticos hasta su restablecimiento. En cuanto al número de animales utilizado, la normativa vigente indica que tiene que ser el menor posible para una consecución adecuada de los objetivos. En este trabajo hemos utilizado 8 animales, de los cuales, 3 se tuvieron que rechazar por distintos motivos (fallos en el procedimiento estereotáxico, en el transporte del trazador, en la adecuación del fijador utilizado en la perfusión, en el tipo y concentración de los anticuerpos empleados, etc.), por lo que solamente 5 animales (G-1317, G-1336, G-1337, G-1352, G-1365) fueron válidos para su estudio, aunque este número es suficiente para la obtención de datos concluyentes en un trabajo de trazado de conexiones combinado con reacciones inmunocitoquímicas.

Durante el periodo preoperatorio los animales quedaban alojados en el animalario en jaulas individuales apropiadas y aprobadas por los Comités de Ética. El día previo a la operación quirúrgica en la que se inyectaba el trazador, se dejaba al animal en ayunas pero con acceso libre al agua.

#### 3.2 Procedimiento quirúrgico

##### 3.2.1 Elección del trazador

La peroxidasa de rabanilla picante (HRP) es un trazador clásico que tanto en su forma libre como conjugada con aglutinina de germen de trigo (HRP-WGA), se ha

utilizado durante mas de 30 años y ha dado excelentes resultados para el trazado anterógrado y retrógrado de vías nerviosas. Sin embargo, en experiencias previas, hemos visto que cuando se combina este trazador con una reacción inmunohistoquímica es difícil distinguir las neuronas afectadas por los dos tipos de marcaje; esto es debido a que en el revelado final para el procesamiento de los dos productos se utiliza la diaminobenzidina (DAB) y el producto de reacción que se acumula en el soma neuronal tiene el mismo color para el trazador que para el anticuerpo. Por lo tanto hemos buscado un trazador neuronal cuya visualización no interfiera con la de la inmunocitoquímica. Además, la visualización de la HRP requiere fijadores que contengan una proporción alta de glutaraldehído, que es incompatible con las reacciones para inmunohistoquímica.

La subunidad B de la toxina colérica conjugada con oro coloidal (CTb) se viene utilizando desde hace algunos años como trazador retrógrado. Las terminales nerviosas, pero no los axones dañados, incorporan el trazador que se transporta de forma retrógrada en un periodo de tiempo que varía entre 12 h y 42 días, y se puede visualizar fácilmente en lisosomas en los somas y dendritas proximales de las neuronas, como depósitos de punteado negro. La CTb presenta una serie de ventajas con respecto a otros trazadores:

a) Es muy estable y se puede congelar y mantener en alícuotas durante bastante tiempo sin perder su capacidad de transporte.

b) Dependiendo del tamaño de la partícula de oro, permite realizar inyecciones de volumen pequeño (480 nl) lo que se traduce en una mejor precisión de la proyección.

c) Se mantiene en las neuronas sin degradarse durante periodos largos de tiempo (se han constatado hasta 42 días), lo que permite una flexibilidad en los experimentos.

d) Se visualiza especialmente bien bajo campo oscuro.

e) La gran ventaja de la CTb sobre la HRP es que no requiere grandes concentraciones de glutaraldehído, un fijador que deprime drásticamente la inmunoreactividad de muchos antígenos; por lo tanto, la CTb se puede utilizar combinada con reacciones de inmunohistoquímica: con el microscopio óptico, el producto amorfo y de color marrón del DAB como resultado de la reacción inmunohistoquímica, se distingue claramente de los depósitos densos y de color negro con bordes bien definidos que resultan de la intensificación con plata de la CTb. De esta manera, las neuronas inmunoreactivas y que muestran marcaje retrógrado, son fácilmente reconocibles (Llewellyn-Smith et al 1990).

El producto que hemos escogido como trazador neuronal retrógrado es Cholera Toxin B Subunit-Colloidal Gold Conjugate, 7nm (List Biological Laboratories , Inc. Campbell, California. USA) utilizado a una dilución al 50% en agua bi-distilada. En cuanto a la cantidad de trazador que se inyecta, después de una serie de pruebas, hemos comprobado que la cantidad óptima a inyectar es 1  $\mu$ l, que es la cantidad necesaria para que haya un transporte fiable para la distancia desde el tronco del encéfalo al prosencéfalo, a la vez que una cantidad que restringe la extensión de la inyección evitando que el trazador se extienda fuera de los límites del vRPO.

### 3.2.2 Cálculo de las coordenadas de inyección en el vRPO

De acuerdo con trabajos previos y siguiendo el atlas de Reinoso-Suárez (1961b), el vRPO está situado entre las siguientes coordenadas estereotáxicas (Figura 3.1):

- coordenada antero-posterior: desde el plano +1.0 hasta el plano -3.5
- coordenada lateral: desde el plano 1.0 hasta el plano 4.0
- coordenada vertical: desde el plano 3.0 hasta el plano 5.0

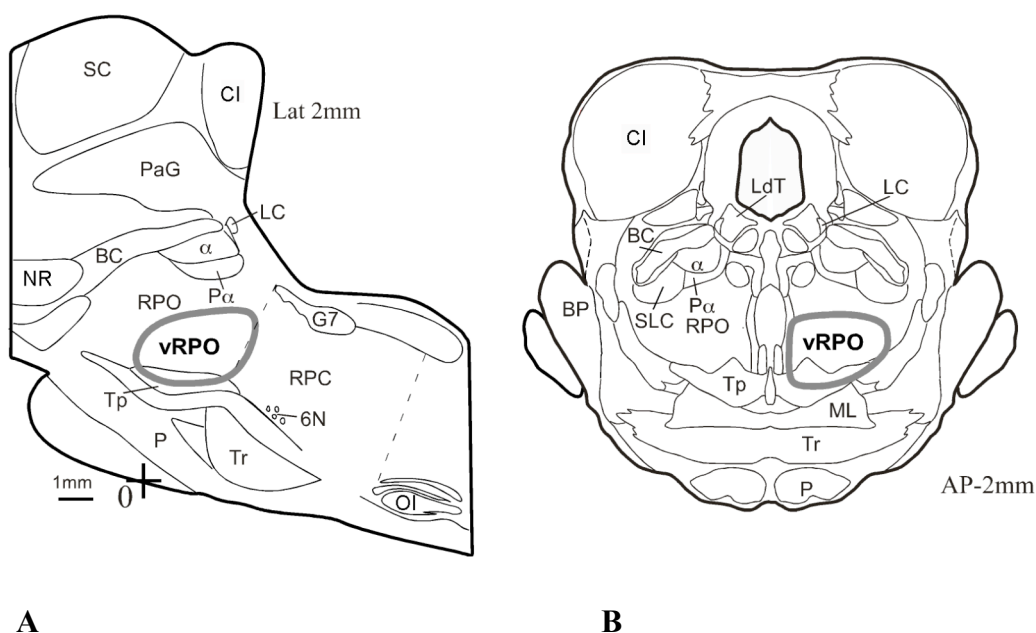


Figura 3.1.- Dibujos esquemáticos de cortes sagital (A) y transversal (B) tomados del atlas de Reinoso-Suárez (1961b), donde se delimita con línea gris de trazo grueso la extensión del vRPO. La cruz en A indica el punto 0 de las coordenadas antero-posterior y vertical. Ver la lista de abreviaturas.

La inyección del trazador se realiza en un punto espacial del encéfalo donde confluyen las tres coordenadas estereotáxicas; en nuestro caso, las coordenadas que se

escogieron para realizar el depósito del trazador en el vRPO fueron: antero-posterior - 1.0, lateral 2.0 y vertical 4.0, ya que este punto está aproximadamente situado en el centro del núcleo y el trazador se extiende dentro de sus límites. El punto de inyección se calcula, lógicamente antes de la cirugía, de la siguiente manera: en el cuadro estereotáxico se fija el punto 0 de las 3 coordenadas estereotáxicas con una punta de vidrio fina, que se fabrica con un *estirador* de pipetas, acoplada a una torre estereotáxica vertical, y mediante sumas y/o restas algebraicas se calcula el punto de inyección; a continuación se lleva la punta de la pipeta a las coordenadas de inyección y se hace coincidir ese punto con el orificio de salida de una jeringa Hamilton biselada de 1  $\mu$ l que se va a utilizar para la inyección, acoplada a otra torre estereotáxica inclinada 33° hacia el plano posterior (Figura 3.2).



Figura 3.2.- Fotografía de la mesa de operaciones y cuadro estereotáxico del quirófano experimental, mostrando el procedimiento para tomar las coordenadas de inyección del trazador. En la torre vertical está acoplada una pipeta de vidrio cuya punta está en el punto estereotáxico de inyección. La torre inclinada lleva acoplada la jeringa Hamilton cuya punta se ha hecho coincidir con la de la pipeta. La inclinación de la torre(33°) permite abordar el punto de inyección evitando la tienda del cerebelo.

### 3.2.3 Inyección del trazador en el vRPO

Una vez calculadas las coordenadas de inyección, el animal se anestesia mediante una inyección intraperitoneal en la que se mezcla ketamina y medetomidina 0.1cc/Kg de peso, además de 0.1cc/Kg de peso, de atropina que se inyecta subcutánea. El animal anestesiado se rasura y se coloca en el cuadro estereotáxico donde queda perfectamente sujeto por dos barras metálicas laterales que se introducen en el conducto auditivo externo, dos barras apoyadas sobre el reborde orbitario inferior y una barra colocada en el paladar que ejerce presión hacia arriba; a continuación, se lava la cabeza del animal con una solución de povidona yodada (Betadine).

La cirugía comienza haciendo una incisión longitudinal de unos 8 cm en la piel y el tejido subcutáneo, se separan los bordes de la herida, se desinserta el músculo parietal del lado izquierdo hasta la región occipital y se limpia el hueso occipital de periostio. Cuando está expuesta la zona quirúrgica, se toma la torre estereotáxica que lleva acoplada la jeringa Hamilton y que, como se mencionó anteriormente, está inclinada 33° hacia el plano posterior para, entrando por la fosa posterior, evitar el hueso tentorio y se lleva a las coordenadas de inyección antero-posterior y lateral; se baja entonces la jeringa en el plano vertical hasta que la punta toca al hueso y se señala ese punto con un lápiz como punto de apertura. Se retira la torre y se trepana el hueso en el punto señalado con un torno que se procura esté también inclinado unos 33°, pues el hueso es bastante grueso en esa región y un trépano vertical puede estorbar la entrada oblicua de la aguja. Cuando están abiertos la tabla y el diploe se pueden ver por el trépano las laminillas del cerebelo, se procede a abrir la duramadre con el bisel de una aguja normal, se deja salir el líquido cefalorraquídeo y se limpia después la zona hasta que queda seca. Se carga al máximo la jeringa Hamilton con la solución de CTb y se comprueba que sale el líquido por el orificio de salida. Después de limpiar la punta de líquido se baja con cuidado la jeringa a las coordenadas calculadas comprobando que no roza los bordes del trépano y se espera 3 minutos en el lugar de inyección para que el tejido se cierre sobre la punta de la aguja. Se inyecta entonces a pulso 1 µl de la solución del trazador, de una sola vez y procurando que la descarga dure aproximadamente 5 minutos. Después de esperar otros 5 minutos para minimizar la difusión de la solución y permitir que el tejido se cierre alrededor de la punta de la aguja, se saca despacio la jeringa. Para terminar, se taponan el trépano con cera, se sutura la incisión con seda de 2/0 y se aplica a la herida una solución antiséptica de violeta de genciana y cloranfenicol (Veterin Fenicol).

### **3.2.4 Periodo postoperatorio y perfusión de los animales**

Es importante que el animal se despierte cuanto antes de la anestesia, no solo por su propio bienestar, si no también para que el trazador empiece a transportarse. Por lo tanto después de la cirugía se revierte la anestesia mediante una inyección intraperitoneal de atipamezol a una dosis de 0.05 cc/Kg y se aloja al animal en el animalario en una jaula apropiada vigilando las condiciones higiénicas. La supervivencia de los animales fue de 10 días, que es un periodo de tiempo suficiente para que el trazador se transporte a todas las regiones del encéfalo, durante los cuales se vigila la evolución del postoperatorio. Se administra como antibiótico cloxacilina de 500 mg (Orbenin) los 2 días siguientes a la operación y en el caso de que el animal necesite un analgésico se utiliza meloxicam, 1.5 cc/Kg.

Pasado este periodo, los animales se sacrifican mediante anestesia profunda con una sobredosis de pentobarbital sódico (Dolethal, 35 mg/Kg) inyectado intraperitonealmente y se procede inmediatamente a su perfusión. El sistema de perfusión consiste en una bomba peristáltica de flujo variable que distribuye los líquidos de perfusión por el sistema arterial del animal. Se coloca al animal sobre el dorso sobre una rejilla y se realiza un corte longitudinal desde la región pre-esternal hasta la abdominal; tras retirar la piel lateralmente se cortan las costillas a ambos lados del esternón y se libera al corazón de sus envueltas pericárdicas; cuando quedan visibles los orígenes de las arterias aorta y pulmonar, se hace un corte en el ventrículo izquierdo y en ese momento se introduce una cánula acoplada al sistema de perfusión que está ya puesto en marcha; la cánula se deja alojada en la aorta ascendente sujeta con una pinza gastrointestinal; a continuación, se corta la aurícula derecha para evacuar la circulación de retorno y se pinza la aorta descendente a nivel torácico para limitar el paso de los líquidos de perfusión hacia la región de la cabeza. La composición, cantidad y orden del paso de las soluciones de perfusión se detalla a continuación:

1º) 1 litro de suero salino fisiológico perfundido a velocidad media, de manera que tarde unos 10 minutos en pasar, para lavar los vasos de sangre. Se le añade al suero 1cc de heparina para evitar la formación de coágulos.

2º) 3 litros de fijador. La solución fijadora es paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M a pH 7.4. El paso del fijador se hace con dos velocidades, una primera a velocidad alta y en la que pasan unos 250 cc de fijador en unos 5 minutos, y se deja luego pasar el resto de fijador a velocidad lenta, de manera que el proceso completo dure unos 45 minutos.

3º) 1 litro de sacarosa al 5%, 1 litro de sacarosa al 10% y ½ litro de sacarosa al 20% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4.

**Protocolo para tampón fosfato 0.2 M**

- Se pesan 31.7 gr de Sodio di-Hidrógeno Fosfato 1-hidrato
- Se pesan 113 gr de di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro
- Se disuelven en 5 l de H<sub>2</sub>O destilada
- Se ajusta el pH a 7.4 con ácido acético o hidróxido sódico
- Se añaden tampón fosfato 0.2 M y H<sub>2</sub>O en la misma proporción para conseguir tampón 0.1 M.

**Protocolo para solución fijadora**

- Se calienta 1 l de H<sub>2</sub>O destilada a 60° C y se le añaden 120 gr de paraformaldehído
- Se disuelve hasta que esté completamente transparente añadiendo 3 cc de hidróxido sódico
- Cuando está frío se le añade 1.5 l de tampón fosfato 0.2 M
- Se ajusta el pH a 7.4
- Se enrasa con H<sub>2</sub>O destilada hasta completar 3 l

Una vez terminada la perfusión se abre la calota y, antes de extraer el encéfalo, se vuelve a colocar la cabeza en el cuadro estereotáxico; con ayuda de una hoja de bisturí acoplada a la torre estereotáxica vertical se secciona el cerebro por el plano AP +6 para obtener un bloque anterior, donde quedan las estructuras prosencefálicas, y un bloque posterior, donde queda el tronco del encéfalo. Se extraen los dos bloques y si se aprecia que el tejido está algo blando se puede hacer una postfijación introduciendo durante un par de horas los dos bloques de cerebro en el mismo fijador utilizado en la perfusión, en agitación y a temperatura ambiente. Los bloques se almacenan luego en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato, en la que se dejan en agitación en cámara fría, durante un mínimo de 5 días o hasta que los bloques descendan al fondo del recipiente. La perfusión con concentraciones crecientes de sacarosa y su posterior almacenamiento en sacarosa al 30% se hace con motivo de criopreservar el tejido durante su posterior tratamiento; la función de la sacarosa en el proceso de criopreservación consiste en crear un medio hiperosmótico a nivel extracelular para evitar la formación de microcristales intracelulares que al congelar el tejido pueden hacer estallar a las células.

### **3.3. Procesamiento del tejido**

#### **3.3.1. Sección del cerebro**

Los dos bloques de cerebro se seccionan por separado en un micrótopo de congelación (criostato Leica) a -15° C, lo que se consigue mediante un generador de frío acoplado al micrótopo. El bloque de cerebro se adhiere a la platina del micrótopo

mediante un producto especial, *Tissue Teck*, que actúa como pegamento y se rodea al tejido con nieve carbónica durante todo el periodo de sección. Las secciones se realizan en el plano transversal a 40  $\mu\text{m}$  de grosor. Como norma general, se secciona primero el bloque posterior, que es el que contiene el área de inyección, para procesarlo primero y comprobar que la inyección del trazador se ha realizado correctamente en cuanto a su localización, cantidad y difusión.

Los cortes seriados del tejido se recogen con un pincel y se llevan a 4 bandejas provistas con rejillas de 35 pocillos (7x5) cada una, que contienen una solución de tampón fosfato 0.1M a pH 7.6. Los cortes se recogen alternativamente en cada pocillo y en cada bandeja; cuando se llega al pocillo 35 se vuelve a empezar en el pocillo 1y se continúa así hasta que todo el bloque de tejido está cortado. De esta manera se obtienen 4 series alternativas de secciones, que suelen tener entre 100 y 120 secciones cada una, que se destinan a diferentes procesamientos:

1) La primera serie para revelado de la CTb, lo que permite visualizar tanto el área de inyección del trazador como los somas neuronales marcados de manera retrógrada; con esta serie obtenemos información de las neuronas que están enviando sus axones al vRPO.

2) La segunda serie se utiliza para realizar un doble marcaje, es decir, se combina el revelado de CTb con el procesamiento inmunocitoquímico contra GAD; en esta serie se pueden visualizar las neuronas marcadas solamente con CTb (CTb-positivas), las inmunopositivas para GAD (GAD-positivas) y las que están marcadas por los dos procedimientos (CTb/GAD-positivas); esta serie nos permite poner de manifiesto las neuronas GABAérgicas que proyectan al vRPO.

3) La tercera serie se destina a un procesamiento para el estudio arquitectónico de las estructuras anatómicas mediante técnicas histológicas clásicas, de las que se ha elegido la tinción de Nissl.

4) La cuarta serie se deja para reserva, ya que pueden ocurrir fallos en todos los pasos de la metodología, y se guarda en una solución anticongelante en un congelador de -20° C. La solución anticongelante tiene la ventaja de permitir almacenar durante periodos prolongados de tiempo el tejido ya cortado, o incluso procesado, sin que se congele ni pierda sus propiedades.



**Solución anticongelante para almacenar secciones**

- 100 cc de tampón f (33.65 gr de fosfato sódico monobásico y 7.7 gr de hidróxido sódico (lentejas) en 1 l de H<sub>2</sub>O destilada)
- 300 cc de glicerina
- 300 cc de etilen-glicol
- 300 cc de H<sub>2</sub>O destilada

**3.3.2 Procesamiento para revelado de CTb (modificado de Llewellyn-Smith et al 1990)**

El proceso de sección de un bloque de cerebro puede durar 5 ó 6 horas, así es que las secciones se guardan en nevera a 4° y normalmente se empiezan a procesar al día siguiente, aunque pueden permanecer 3 ó 4 días en nevera en buenas condiciones. Si se han tenido que almacenar las secciones, se sacan del líquido anticongelante el día anterior y se lavan en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4; se hacen 4 ó 5 lavados, los primeros de menor duración que los últimos, hasta que las secciones estén limpias del anticongelante.

Se procesan para el revelado de CTb las dos primeras series de los bloques anterior y posterior, siguiendo el método de Llewellyn-Smith et al (1990), que hemos modificado de acuerdo a nuestro caso particular de la siguiente manera:

1) Se comienza por introducir las secciones en etanol al 50% durante 20 minutos, con agitación y a temperatura ambiente, para permeabilizar las membranas celulares.

2) Lavado de las secciones en un tampón citrato-acetato 0.2 M a pH 5.5; se hacen tres lavados de 20 minutos cada uno, con agitación y a temperatura ambiente.

3) Intensificación con plata para visualizar la CTb. Se incuban las secciones en un *kit* de intensificación de plata (IntenSE BL silver enhancement kit. Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), mezclando el Initiator y el Enhancer en la misma proporción. Se hacen, como norma general, tres incubaciones de 20 minutos en la mezcla, con lavados intermedios en el tampón citrato-acetato de 5 minutos cada uno. La mezcla se hace inmediatamente antes de cada incubación, y las secciones se incuban en oscuridad, pues el producto de reacción de la plata se degrada con la luz. Hay que poner especial cuidado en manipular las secciones con material de vidrio para evitar la contaminación con otros metales. Todas las incubaciones y lavados se hacen a temperatura ambiente y en agitación.

4) Después de un breve lavado en agua destilada, se hace una postfijación, para lo cual, las secciones pasan por tres lavados de 5 minutos cada uno, en tiosulfato sódico al 5%.

5) Después de otro lavado breve en agua destilada, los cortes se lavan en el tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 y se quedan almacenados durante toda la noche, en refrigeración, en el mismo tampón.

6) Al día siguiente, las secciones de la primera serie se montan en portas gelatinizados manteniendo la secuencia. Estas secciones se montan en una placa de Petri que contiene una dilución 1:3 del tampón fosfato en agua destilada y después de dejar que se sequen durante 2 días se contratiñen con tionina.

#### **Protocolo para tampón citrato-acetato**

- Se disuelven 4.2 gr de ácido cítrico en 100 cc de H<sub>2</sub>O destilada
- Se disuelven 1.54 gr de acetato amónico en 100 c de H<sub>2</sub>O destilada
- Se mezclan las dos soluciones y se ajusta el pH a 5.5 con una solución de hidróxido amónico al 25%
- Se enrasa hasta 400 cc con H<sub>2</sub>O destilada

#### **Protocolo para tinción con tionina**

- Tinción de las secciones en una solución de tionina al 0.25% en 952 cc de H<sub>2</sub>O destilada, 12 cc de ácido acético glacial y 36 cc de hidróxido sódico 1 N, mantenida a 37° C, de 1 a 5 minutos
- Deshidratación mediante pasos de 5 minutos en etanol al 70%, 96% y 100%
- Deshidratación en xiloles durante 1 hora
- Se cubren con DePeX y se dejan secar a temperatura ambiente

### **3.3.3 Procesamiento para doble marcaje (CTb/GAD)**

Las técnicas de inmunohistoquímica se basan en la afinidad específica entre los antígenos y los anticuerpos (inmunoglobulinas) que forma un complejo antígeno-anticuerpo. El procedimiento en general consiste en incubar un anticuerpo, monoclonal o policlonal obtenido frente a una determinada molécula neuroquímica, con el tejido donde se unirá la molécula contra la que va dirigido el anticuerpo. El lugar de unión se revela por métodos directos o indirectos. Con el método indirecto, el tejido incubado con el anticuerpo de interés (anticuerpo primario), se incuba nuevamente con un anticuerpo secundario producido en una especie diferente, dirigido contra el anticuerpo primario y marcado con biotina (método de la avidina-biotina); el anticuerpo secundario se une al primario marcando la posición del antígeno que se busca. La

localización del anticuerpo secundario se hace revelando la presencia de la biotina con el complejo avidina-biotina (ABC) (Hsu et al 1981).

La elección del anticuerpo primario es fundamental. En nuestro caso es además complicado, pues la molécula de GABA es pequeña y la señal es muy débil. Por esa razón la casi totalidad de los estudios dedicados a la localización de estructuras GABAérgicas se hace utilizando un anticuerpo contra su enzima sintetizadora, la decarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Hemos utilizado con poco éxito anticuerpos policlonales contra GABA obtenidos frente a conejo, cobaya y oveja, y anticuerpo policlonales contra las subunidades de 65 y 67 KDa de la enzima sintetizadora, hasta encontrar el anticuerpo idóneo, la *anti-glutamic-acid decarboxylase* (anti-GAD-6).

Una vez procesadas para el revelado de CTb, las secciones de la segunda serie del bloque anterior se dejan al menos toda la noche en el tampón fosfato antes de proceder al procesamiento inmunohistoquímico, que se hace mediante los siguientes pasos:

1) Inactivación de la peroxidasa endógena. Este proceso metaboliza la peroxidasa endógena presente en el tejido, con lo que se reduce el marcaje inespecífico (fondo o *background*). Para ello, se incuban las secciones en una solución que contiene metanol al 10% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.1% en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 durante 15 minutos, a temperatura ambiente y sin agitación, ya que la reacción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es muy agresiva para el tejido.

2) Lavado de las secciones en el tampón fosfato. Se lava tres veces en agitación durante 10 minutos para eliminar completamente el metanol y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del tejido.

3) Preincubación para el anticuerpo primario. Las secciones se incuban en una solución que contiene 5% de albúmina de suero bovino (BSA) y 30% de suero normal de caballo (NHS) en tampón fosfato salino (ClNa al 9% en tampón fosfato, PBS) durante 3 horas. Este paso permite preparar de alguna manera el tejido para la penetración de los reactivos inmunocitoquímicos; además, mediante los sueros normales, BSA y NHS, se bloquean los lugares inespecíficos de unión que puedan reconocer los anticuerpos secundarios.

4) Incubación en el anticuerpo primario. Las secciones se incuban en la misma solución anterior que utilizamos en el paso anterior, a la que se añade el anticuerpo primario en proporción 1:100. La incubación dura 72 horas, las 3 ó 4 primeras horas se hace en agitación a temperatura ambiente y el resto del tiempo en cámara fría, siempre en agitación. El anticuerpo primario que hemos utilizado es la subunidad de 64 kDa de anti-GAD-6 obtenido en ratón (GAD anti-mouse). Este anticuerpo monoclonal procede

del “Developmental Studies Hybridoma Bank” de la Universidad de Iowa, desarrollado por el Dr. D.I. Gottlieb, y se ha comprobado su efectividad para marcar neuronas GABAérgicas (ver para mas información [www.uiowa.edu/dshbwww/gad6.html](http://www.uiowa.edu/dshbwww/gad6.html)).

En todos los casos se utilizaron cortes que contenían el núcleo reticular del tálamo y el colículo inferior como cortes control; se incubaron en paralelo con los cortes de la serie, pero no se les añadió el anticuerpo primario, si no que continuaron en la solución de preincubación para seguir después los mismos pasos.

5) Lavado en una solución de NHS al 1% en PBS (NHS-PBS); se hacen tres lavados de 10 minutos cada uno.

6) Incubación en el anticuerpo secundario. Las secciones se incuban en el anticuerpo secundario, obtenido de caballo contra ratón y conjugado con biotina (*biotinylated horse anti-mouse*. Chemicon. Temecula. CA, USA), en proporción de 1:200 en NHS-PBS. La incubación se hace en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas.

7) Lavado de las secciones en NHS-PBS. Se hacen tres lavados de 10 minutos cada uno.

8) Incubación en el *kit* ABC, complejo avidina-biotina, (Elite ABC kit. Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Se incuban las secciones durante 1 hora y media en una solución que contiene 25 µl del reactivo A (avidina) y 25 µl del reactivo B (HRP biotinilada) por cada 5 cc de NHS-PBS. La solución se prepara 30 minutos antes de su utilización que es el tiempo requerido para que tenga lugar la reacción química.

9) Lavado de las secciones. Se hacen dos lavados de 10 minutos cada uno en NHS-PBS y un lavado de 10 minutos en el tampón fosfato 0.1 M.

10) Revelado de la HRP. Las secciones se revelan en una solución que contiene 0.05% de 3-3'DAB y 0,003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón fosfato 0.1 M durante un periodo de tiempo que se controla bajo microscopio y que suele variar entre 8 y 10 minutos.

11) Lavado de las secciones. Se hacen tres lavados de 10 minutos cada uno en tampón fosfato 0.1 M y se dejan las secciones almacenadas durante toda la noche en el mismo tampón, en refrigeración.

12) Al día siguiente se montan las secciones en portas gelatinizados y se dejan secar durante 2 días antes de iniciar el proceso de deshidratación y de cubrirlas con DePeX, sin contrateñir.

Todos los pasos se hacen a temperatura ambiente y en agitación, excepto el paso 1) en el que es preferible no utilizar agitación, y el paso 4) que se hace principalmente en cámara fría.

### **3.3.4 Tinción con la técnica de Nissl**

Las secciones de la tercera serie de los bloques anterior y posterior se utilizan para su tinción con la técnica de Nissl. Esta técnica clásica se basa en la afinidad de los colorantes básicos por los ácidos nucleicos del núcleo celular, así como por los polirribosomas y retículo endoplásmico rugoso del citoplasma. Los cortes de esta serie se montan sobre portas gelatinizados, bien directamente al tiempo del corte, o bien después de su almacenamiento en formalina, y se tiñen siguiendo el protocolo clásico que utiliza como colorante el violeta de cresilo.

#### **Protocolo para técnica de Nissl**

- Se dejan las secciones en etanol al 70% durante toda la noche
- Dos lavados breves en H<sub>2</sub>O destilada
- Tinción en la solución de violeta de cresilo (5 gr de violeta de cresilo en 500 cc de H<sub>2</sub>O destilada a la que se añaden 0.25 cc de ácido acético glacial); de 5 a 10 minutos en baño a 40°, en agitación
- Dos lavados breves en H<sub>2</sub>O destilada
- Deshidratación mediante 1 minuto en etanol al 70% y 1 minuto en etanol al 96%
- Paso por cloroformo al 100% durante 10 minutos, en agitación
- Un paso breve por etanol al 96%
- Diferenciación en etanol-acético (960 cc de etanol al 96% y 17 cc de ácido acético glacial)
- Deshidratación mediante 1 minuto en etanol al 100%
- Deshidratación y aclarado mediante tres pasos de 10 minutos por xileno
- Se cubren los portas con DePeX y se dejan secar a temperatura ambiente

### **3.4. Estudio del material histológico**

Las secciones del tejido procesado para revelado de CTb y para doble marcaje se dibujaron sobre papel mediante un proyector de preparaciones (Leitz GMBH Wetzlar), delimitando tanto el contorno de la sección como todas las estructuras identificables. Sobre este dibujo, y estudiando la preparación mediante un microscopio Zeiss Axioscop, se marca cada neurona CTb-positiva y cada neurona CTb/GAD-positiva. Las neuronas inmunopositivas para GAD no se marcaron debido a que su localización ya es conocida y a la complejidad del estudio, ya que el número de neuronas es enorme y el neuropilo queda bastante teñido por la reacción de GAD, sobre todo en las estructuras

que tienen muchas fibras de paso. Los cortes de la serie procesada para CTb se estudiaron bajo campo oscuro y los de la serie procesada para doble marcaje, bajo campo claro y comprobando la presencia de granos de plata bajo campo oscuro.

Los cortes de tejido de la serie teñida con técnica de Nissl se estudiaron al microscopio o mediante el proyector de preparaciones y se utilizaron para el análisis de la morfología general y para comprobar la delimitación los distintos núcleos y estructuras cerebrales, siguiendo los atlas de Reinoso-Suárez (1961b) y de Avendaño and Reinoso-Suárez (1975).

Las imágenes fotográficas se tomaron directamente desde el microscopio óptico, que lleva acoplada una cámara Spot Insight Color, y se procesaron con el programa Spot Advanced; a las fotografías no se les aplicó ningún filtro ni intensificador de color, brillo o contraste. Los dibujos y el alineado de fotografías para componer las figuras se hicieron con el programa Canvas 10.3.9 (Deneba software. Fl, USA).

### **3.5 Análisis de datos cuantificables**

Para cuantificar los datos es necesario hacer un recuento de las neuronas gabaérgicas y no-gabaérgicas que proyectan al vRPO. Lo ideal para hacer un recuento neuronal es aplicar un método estereológico, pero en nuestro caso no ha sido posible debido a varios factores: el grosor de los cortes, que debería ser de 50  $\mu\text{m}$ ; la baja penetrabilidad del anticuerpo, que no permite hacer cortes de mas de 40  $\mu\text{m}$  de grosor y podría producir falsos negativos; la dificultad para delimitar los núcleos.

Por tanto, el recuento neuronal se ha hecho contando todas las neuronas CTb-positivas y CTb/GAD-positivas en todas las secciones de la serie procesada para doble marcaje en todos los animales. El recuento de las neuronas GAD-positivas resulta prácticamente imposible debido a la densidad de fibras en el neuropilo. Se han obtenido los porcentajes de las neuronas GABAérgicas y no-GABAérgicas que proyectan al vRPO en la zona incerta, área hipotalámica dorsal, área hipotalámica lateral y núcleo reticular del tálamo. En el resto de las estructuras se presentan solo las cantidades relativas de estos dos tipos de neuronas (Tabla 4.1).

## *4. RESULTADOS*

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Localización de las inyecciones de trazador

La descripción de los resultados obtenidos en nuestro estudio comienza con la localización y delimitación, en los 5 animales utilizados, del área del vRPO donde se produjo el depósito de CTb, así como del área afectada por la extensión inevitable del trazador. El estudio microscópico de las preparaciones del bloque posterior de la serie procesadas para CTb mostró que la inyección del trazador que recibió cada uno de los cinco animales estaba en sectores del vRPO que se han demostrado como efectivos para inducir sueño REM con estimulación química (Figura 4.1). El centro efectivo de todas las inyecciones se localizó entre los planos AP-2 y AP-3 y aunque cada una tiene características peculiares, el conjunto de todas ellas cubrió prácticamente todo el volumen del vRPO.

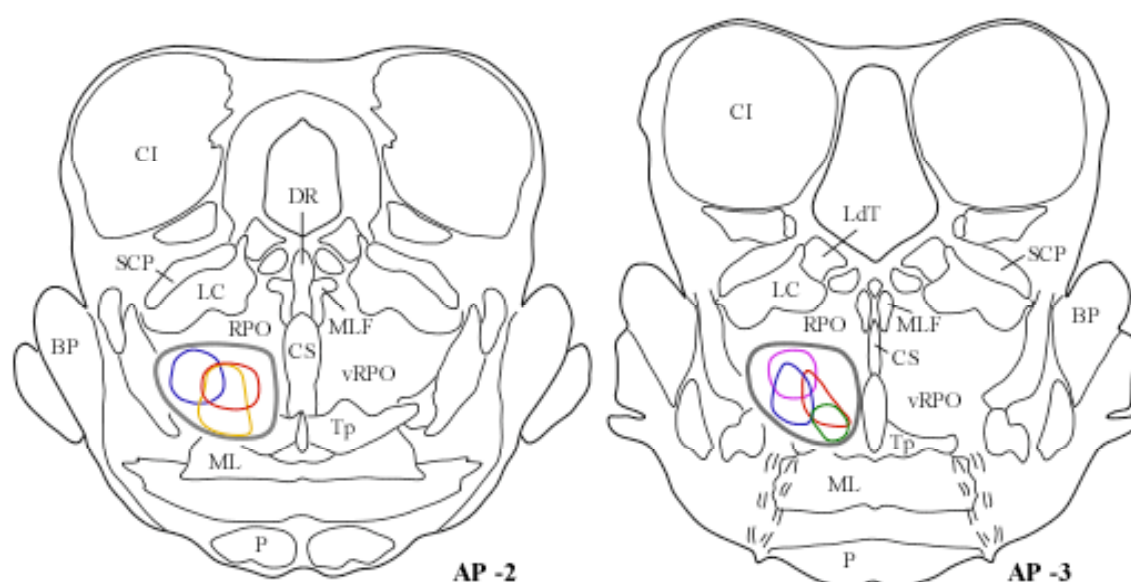


Figura 4.1.- Dibujos esquemáticos, tomados del atlas de Reinoso-Suárez (1961), de cortes transversales de tronco del encéfalo en los planos AP -2 y AP -3 mostrando la localización del lugar efectivo de las inyecciones de CTb en el vRPO, en cada uno de los casos. El vRPO queda delimitado por un trazo gris grueso. [G-1317](#), [G-1336](#), [G-1337](#), [G-1352](#), [G-1365](#).

Aunque la cantidad de trazador inyectado y las coordenadas de inyección son siempre las mismas, las condiciones técnicas hacen que las inyecciones hayan resultado ligeramente diferentes en cuanto a la localización y la extensión del área inyectada. Las inyecciones de los casos G-1352 y G-1365 fueron las mas extensas y ocuparon sectores



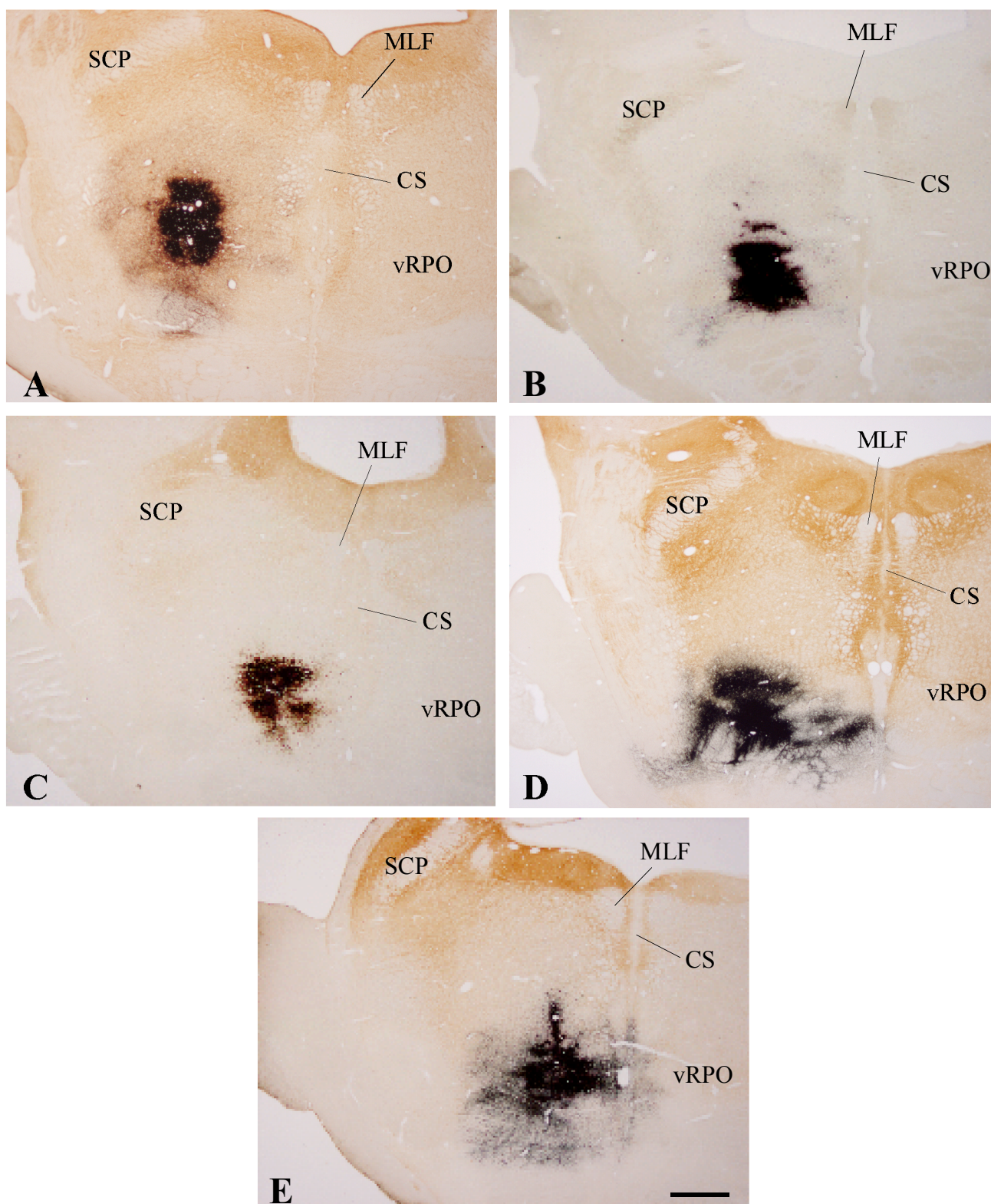


Figura 4.2.- Microfotografías de cortes coronales del tronco del encéfalo de cada animal mostrando el depósito de la inyección de CTb en el vRPO. A: G-1317, B: G-1336, C: G-1337, D: G-1352, E: G-1365. A,C,D y E: procesamiento para doble marcaje (CTb/GAD). B: procesamiento para CTb. Barra de calibración= 960 $\mu$ m.

más laterales y ventrales del vRPO (Figuras 4.1, 4.2D, 4.2E); G-1365 ocupó también el sector mas caudal y G-1352 el mas rostral del vRPO. En los casos G-1317, G-1336 y G-1337 el depósito del trazador tiene una extensión menor y las inyecciones quedaron localizadas en el sector central del vRPO, si bien en el caso G-1317 la inyección se extendió ligeramente hacia zonas dorsales (Figuras 4.1, 4.2A, 4.2B, 4.2C).

El estudio de las preparaciones de las series procesadas para CTb y doble marcaje nos permitió detectar la presencia de neuronas CTb-positivas y doblemente marcadas (CTb/GAD-positivas) que se distribuyeron prácticamente en todos los niveles del prosencéfalo basal, diencéfalo y tronco del encéfalo en todos los casos, por lo que el transporte del trazador se realizó de manera satisfactoria. La localización anatómica de estas neuronas se comprobó utilizando la serie paralela procesada con la técnica de Nissl y basándonos en los atlas de Reinoso-Suárez (1961b) y de Avendaño and Reinoso-Suárez (1975) para delimitar las distintas estructuras. En todos los casos, tanto el número de neuronas de ambos tipos como su distribución topográfica fue muy semejante, por lo que no haremos una descripción pormenorizada para cada animal de los resultados.

#### **4.2 Distribución de las neuronas GAD-positivas**

El estudio del material microscópico de las series procesadas para la reacción inmunocitoquímica contra GAD nos permitió determinar que la distribución y cantidad de las neuronas GAD-positivas no difirió de las descripciones proporcionadas por otros autores sobre la distribución de neuronas GABAérgicas en el tálamo e hipotálamo del gato (De Biasi et al 1986, Arcelli et al 1997, Steriade et al 1997, Abrahamson et al 2001). Estas neuronas GAD-positivas son diferentes en tamaño, forma, número e intensidad inmuno-reactiva dependiendo de las estructuras en las que están localizadas.

En el núcleo reticular del tálamo, que es donde se han definido clásicamente, las neuronas GABAérgicas se caracterizan por estar dispersas y ser poco numerosas, por el soma de forma alargada y orientado en el plano transversal del que surge un pequeño número de dendritas poco ramificadas, y por presentar una reacción GAD-positiva moderada (Figura 4.3).

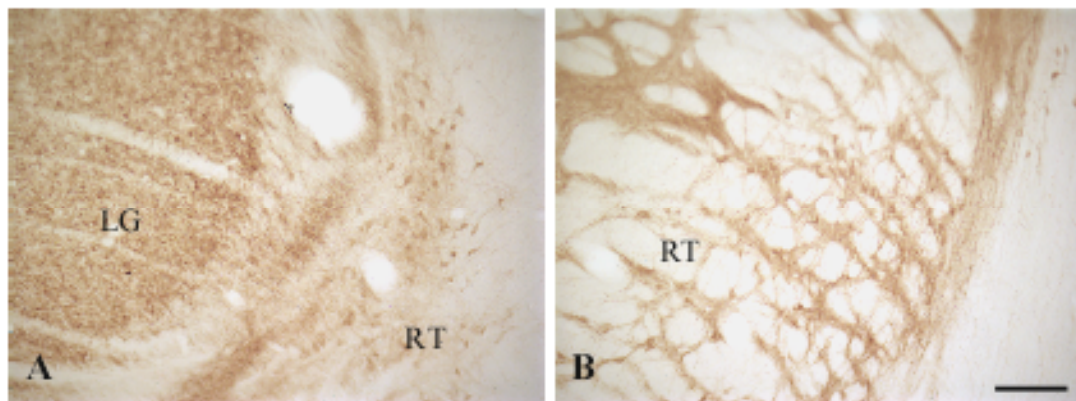


Figura 4.3.- Microfotografías del núcleo reticular del tálamo mostrando sus sectores geniculado (A) e infrageniculado (B), en preparaciones procesadas con técnica inmunocitoquímica contra GAD en el caso G-1365, donde las neuronas GABAérgicas presentan una reacción GAD-positiva moderada. Barra de calibración=570 $\mu$ m.

En la zona incerta, área hipotalámica dorsal, área hipotalámica lateral y área hipotalámica posterior, las neuronas GAD-positivas son más numerosas y están agrupadas, tienen forma redondeada con prolongaciones poco definidas y presentan una reacción intensa ante el GAD. Las neuronas de estas estructuras están entremezcladas con una extensa red de procesos terminales y fibras de paso que ocupan todo el neuropilo y que también presenta una intensa reactividad ante el GAD, lo que dificulta la identificación de las neuronas. Por el contrario, en los núcleos talámicos vecinos, tales como el núcleo ventral posterior del tálamo, las neuronas GAD-positivas son fácilmente identificables pues, aunque son de tamaño pequeño, están homogéneamente repartidas por todo el núcleo, tienen procesos bien definidos y presentan una intensa reactividad para el GAD.

Por último, hemos encontrado estructuras hipotalámicas donde las neuronas GAD-positivas son especialmente llamativas. Es el caso del núcleo hipotalámico dorsocaudal (definido en Avendaño and Reinoso-Suárez 1975), un pequeño núcleo situado junto a la luz del tercer ventrículo, formado por neuronas de tamaño pequeño, redondeadas, densamente apretadas y con reacción muy intensa al GAD (Figura 4.4).

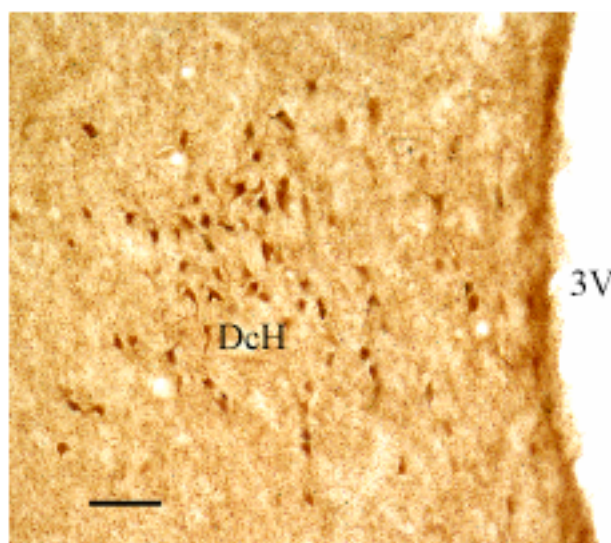


Figura 4.4.- Microfotografía de la zona caudal y dorsal del hipotálamo del caso G-1352 en donde se pueden observar las neuronas GABAérgicas que conforman el núcleo hipotalámico dorsocaudal. 3V: tercer ventrículo. Barra de calibración: 70μm

Las neuronas GAD-positivas están distribuidas homogéneamente por todo el tronco del encéfalo. Estas neuronas son de pequeño tamaño y presentan reacción GAD-positiva moderada, pero la mayor parte del neuropilo está ocupada por una gran maraña de fibras entre la que se encuentran dispersas las neuronas, por lo que son difíciles de detectar (Figuras 4.7F, 4.10C, 4.10D, 4.19C, 4.19D).

### 4.3 Distribución de las neuronas CTb-positivas

Una gran cantidad de neuronas marcadas retrógradamente por el trazador se detectaron en numerosas estructuras y núcleos encefálicos, tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral a la inyección del trazador, y de forma muy similar en todos los casos. Estas neuronas se detectan por la presencia en su citoplasma de granos negros como producto de la reacción del trazador con las sales de plata y son mas fáciles de detectar al microscopio bajo campo oscuro. Son neuronas no-GABAérgicas, de naturaleza bioquímica no detectada, y que proyectan al vRPO.

En el prosencéfalo basal y estructuras telencefálicas las neuronas CTb-positivas se distribuyen bilateralmente, aunque predominantemente en el lado ipsilateral; el mayor número de neuronas lo presentaron los casos G-1352 y G-1337 (Figuras 4.5, 4.8, 4.16A) en los que las inyecciones del trazador se localizaron en posición medial en el

vRPO (Figura 4.1). Las neuronas se distribuyeron exclusivamente en el lado ipsilateral en el área amigdalina anterior y en la sustancia innominada, donde son poco numerosas y dispersas. En cambio, las neuronas son muy numerosas y distribuidas bilateralmente, en las áreas preóptica lateral y preóptica medial además de en el núcleo del lecho de la estría terminal. En el núcleo central de la amígdala y en el núcleo preóptico mediano las neuronas CTb-positivas son muy numerosas y están agrupadas llenando todo el núcleo. (Figuras 4.5, 4.11, 4.13A).

En todos los casos, las neuronas CTb-positivas se distribuyeron prácticamente en toda la extensión antero-posterior del hipotálamo, siendo especialmente abundantes, tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral, en el área hipotalámica lateral, en el área hipotalámica dorsal (Tabla 4.1), en la región perifornical y en el área hipotalámica ventromedial (Figuras 4.5, 4.7D, 4.8, 4.11, 4.13D, 4.14, 4.16D, 4.17). También fueron abundantes las neuronas CTb-positivas, bilateralmente, en el núcleo hipotalámico paraventricular y en el núcleo hipotalámico dorsomedial, en este último principalmente con distribución ipsilateral (Figuras 4.5, 4.8, 4.11, 4.14, 4.17). En menor cantidad, se localizaron neuronas CTb-positivas en el núcleo tuberomamilar y en el área hipotalámica anterior (Figuras 4.5, 4.8, 4.11, 4.14, 4.17). Preferentemente en el lado ipsilateral, encontramos abundantes neuronas CTb-positivas en el área hipotalámica posterior y, en menor cantidad, en el campo H1 de Forel (Figuras 4.5, 4.8, 4.11, 4.14, 4.17). La zona incerta es también una estructura que muestra neuronas CTb-positivas distribuidas por toda su extensión y principalmente en el lado ipsilateral (Figuras 4.5, 4.7C, 4.8, 4.10B, 4.11, 4.13C, 4.14, 4.16C, 4.17, 4.19A). El recuento de neuronas en la zona incerta es similar en todos los animales, con un número medio de 309 neuronas (Tabla 4.1).

En los núcleos lateral de la habénula, centromediano, periventricular, parafascicular y en el núcleo geniculado lateral ventral ipsilateral pudimos detectar una pequeña cantidad de neuronas CTb-positivas en todos los casos (Figuras 4.5, 4.8, 4.11, 4.14).

En el tronco del encéfalo las neuronas CTb-positivas son muy numerosas y su distribución es muy semejante en todos los casos. Estas neuronas se encuentran principalmente en las capas profundas del colículo superior, en la sustancia gris periacueductal, en la formación reticular mesencefálica y en la formación reticular del puente, especialmente en el vRPO contralateral, en el locus coeruleus y en los núcleos del tegmento laterodorsal y pedunculopontino. También en la formación reticular bulbar

las neuronas CTb-positivas se distribuyeron bilateralmente de forma homogénea (Figuras 4.6, 4.7F, 4.9, 4.10C, 4.10D, 4.12, 4.15, 4.18, 4.19C, 4.20D).

#### 4.4 Distribución de las neuronas CTb/GAD-positivas

La presencia de neuronas doblemente marcadas (CTb/GAD-positivas) se detecta en las preparaciones procesadas para doble marcaje. Se caracterizan por su color marrón oscuro, producido por la reacción inmunocitoquímica, junto con la presencia en el citoplasma de granos negros debido a la reacción de la toxina colérica con la plata. Son neuronas GABAérgicas que proyectan al vRPO.

En todos los casos, las neuronas CTb/GAD-positivas son mucho menos abundantes que las CTb-positivas simples y están localizadas preferentemente en las estructuras del lado ipsilateral a la inyección del trazador (Tabla 4.1).

A pesar de que al menos la mitad de las neuronas del prosencéfalo basal son GABAérgicas y de que, como ya hemos visto, las neuronas CTb-positivas son muy abundantes en esta estructura, en ninguno de nuestros casos hemos podido detectar neuronas CTb/GAD-positivas en ninguna estructura del prosencéfalo basal (Figuras 4.5, 4.8, 4.16A).

Por el contrario, las neuronas CTb/GAD-positivas están presentes en varias estructuras diencefálicas. En el tálamo, el mayor número de neuronas CTb/GAD-positivas se encuentra en el núcleo reticular y es importante señalar que la localización de estas neuronas se restringe exclusivamente al núcleo del lado ipsilateral a la inyección del trazador (Figuras 4.5, 4.7A, 4.7B, 4.8, 4.10A, 4.11, 4.13B, 4.14, 4.16B, 4.17). El recuento medio de neuronas en el núcleo reticular del tálamo es de unas 150 neuronas CTb/GAD-positivas (Tabla 4.1). Estas neuronas se pueden localizar en el núcleo reticular del tálamo desde sus niveles mas rostrales, en los planos AP+13 y AP+12, hasta sus niveles más caudales, que llegan hasta el plano AP+7. En los niveles rostrales las neuronas se distribuyen uniformemente en la parte central del núcleo, sin embargo en niveles mas caudales se localizan en su sector infrageniculado; con la salvedad del caso G-1337, en la que el depósito del trazador en el vRPO ocupa poca extensión y las neuronas CTb/GAD-positivas solo se encuentran en la porción infrageniculada (Figura 4.8), la distribución de las neuronas en el núcleo reticular del tálamo en el resto de casos, es totalmente similar. Obviamente, no pudimos distinguir ninguna neurona CTb-positiva simple en toda la extensión del núcleo reticular del tálamo.



En la zona incerta las neuronas doblemente marcadas se extienden desde el núcleo reticular del tálamo prácticamente sin solución de continuidad, donde se mezclan con las numerosas neuronas CTb-positivas (Tabla 4.1) que ocupan esta estructura así como con las neuronas GAD-positivas que se encuentran inmersas entre la profusa red de fibras de paso también inmunopositiva para la reacción de GAD (Figuras 4.5, 4.7C, 4.8, 4.10B, 4.11, 4.13C, 4.14, 4.16C, 4.17, 4.19A). El recuento de estas neuronas en la zona incerta indica que no son muy numerosas (47.5 neuronas CTb/GAD-positivas como media de todos los casos) cuando se compara con el de las neuronas CTb-positivas, ya que representan solo el 15.3% del total de neuronas marcadas (Tabla 1). En la zona incerta sí hemos encontrado, aunque en pequeña cantidad, neuronas CTb/GAD-positivas en el lado contralateral (Figuras 4.5, 4.8, 4.11, 4.14, 4.17).

En el hipotálamo, el número de neuronas doblemente marcadas es también notablemente menor que el de las neuronas CTb-positivas, están preferentemente localizadas en las regiones posteriores y tienen una distribución casi exclusivamente ipsilateral en todos los casos (Figuras 4-5, 4-8, 4-11, 4-14, 4-17). El área hipotalámica dorsal y el área hipotalámica lateral son las estructuras hipotalámicas donde se encuentra el mayor número de neuronas CTb/GAD-positivas y en número prácticamente igual en ambas estructuras, unas 33 neuronas como media. Los porcentajes de estas neuronas, referidos al total de neuronas marcadas, son ligeramente diferentes, el 14% y el 16% respectivamente (Tabla 4.1). En el área hipotalámica dorsal las neuronas CTb/GAD-positivas se encuentran agrupadas en prácticamente toda su extensión antero-posterior, y son especialmente abundantes en el plano AP+8, con un claro predominio ipsilateral; en cambio, en el área hipotalámica lateral las neuronas están dispersas (Figuras 4.5, 4.7D, 4.8, 4.11, 4.13D, 4.14, 4.16D, 4.17, 4.19B). Solo ocasionalmente hemos encontrado neuronas CTb-GAD-positivas en otras estructuras hipotalámicas, tales como el núcleo hipotalámico paraventricular, el campo H1 de Forel o el área perifornical (Figura 4.5).

En el límite dorsal y caudal del área hipotalámica posterior y cercano a la luz del tercer ventrículo, se encuentra una gran cantidad de neuronas CTb/GAD-positivas entre las densamente apretadas y fuertemente GAD-reactivas neuronas del núcleo hipotalámico dorsocaudal, tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral; hay que señalar que, como ocurre también en el núcleo reticular del tálamo, no hemos podido identificar ninguna neurona CTb-positiva en ese núcleo hipotalámico (Figuras 4.4, 4.5, 4-7E, 4.11).

Las neuronas CTb/GAD-positivas son muy poco numerosas en el tronco del encéfalo. Las neuronas se encuentran dispersas tanto por la formación reticular mesencefálica, como por la pontina y la bulbar. A niveles del tegmento pontino, algunas de estas neuronas se localizan en posiciones dorsales cercanas al complejo del locus coeruleus y otras en el vRPO contralateral; también encontramos neuronas marcadas doblemente en la formación reticular bulbar tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral (Figuras 4.6, 4.7F, 4.9, 4.10C, 4.10D, 4.12, 4.15, 4.18, 4.19C, 4.19D).



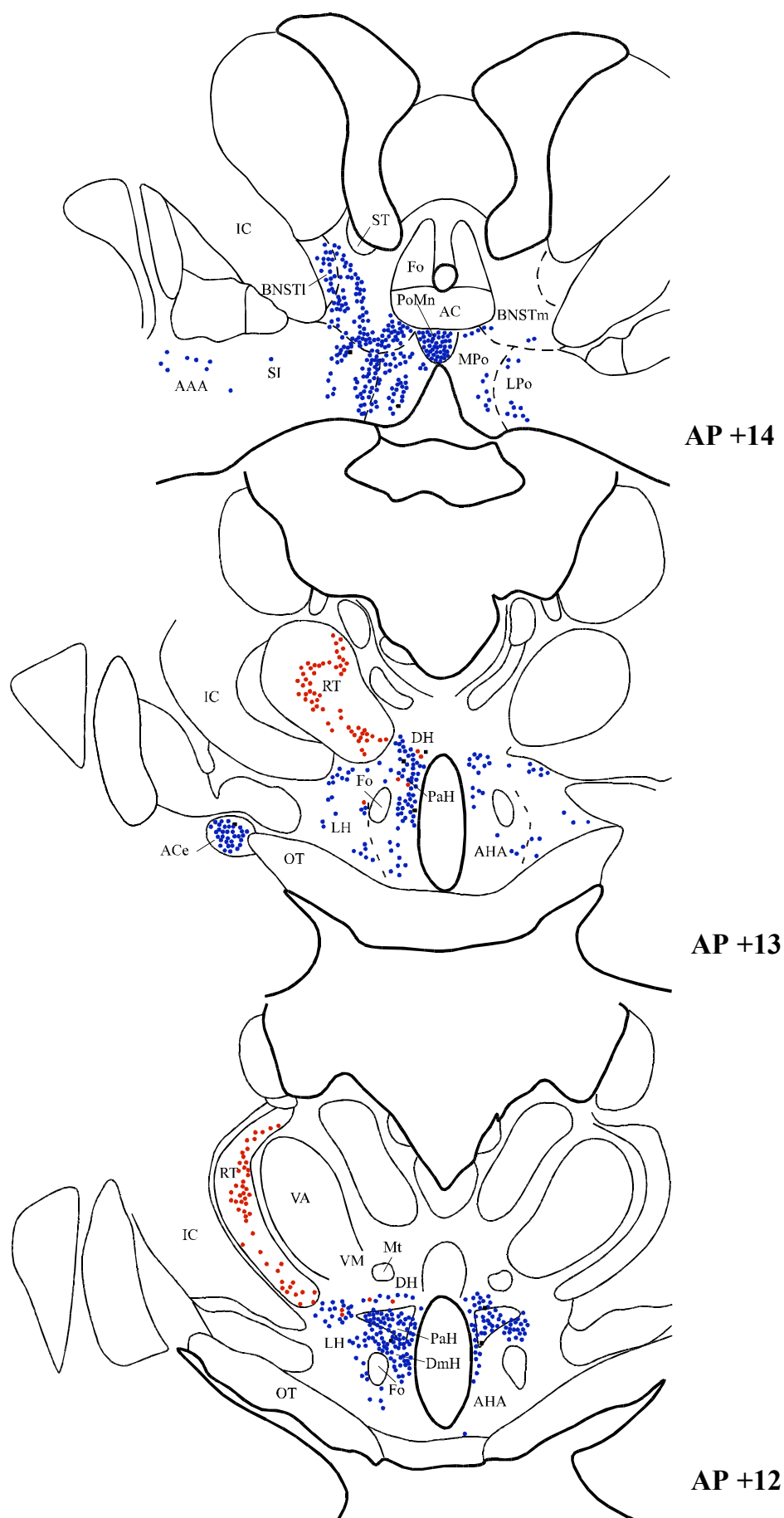


Figura 4.5.- Caso G-1352 (ver pie de figura en página siguiente).

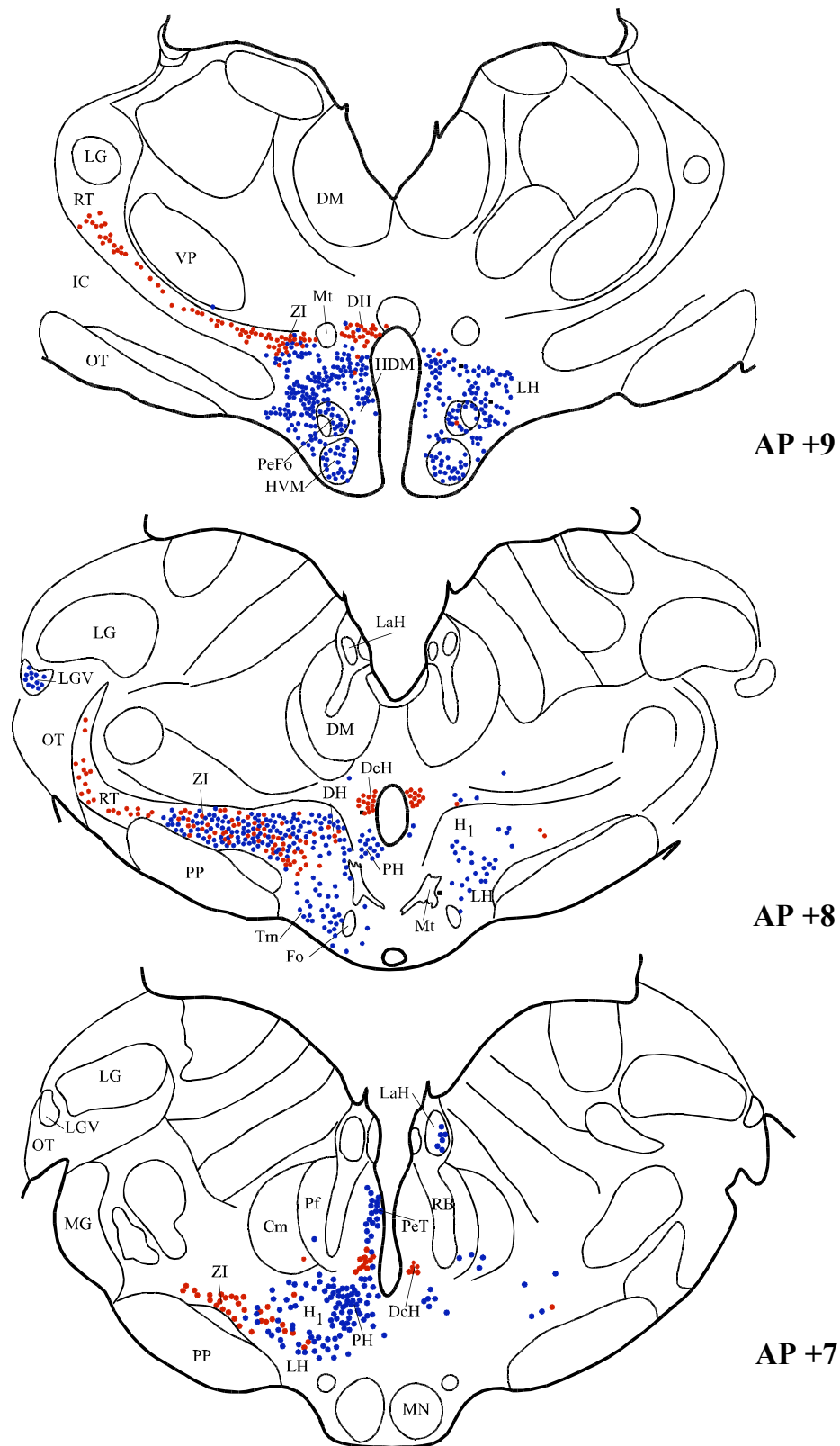


Fig 4.5 (continuación).- Dibujos esquemáticos de cortes transversales de prosencéfalo y tálamo, desde niveles rostrales a caudales, del caso G-1352. Los puntos azules representan neuronas marcadas positivamente con CTb. Los puntos rojos representan neuronas doblemente marcadas (CTb/GAD positivas). Cada punto rojo representa una neurona marcada. Los puntos azules representan densidad de neuronas.

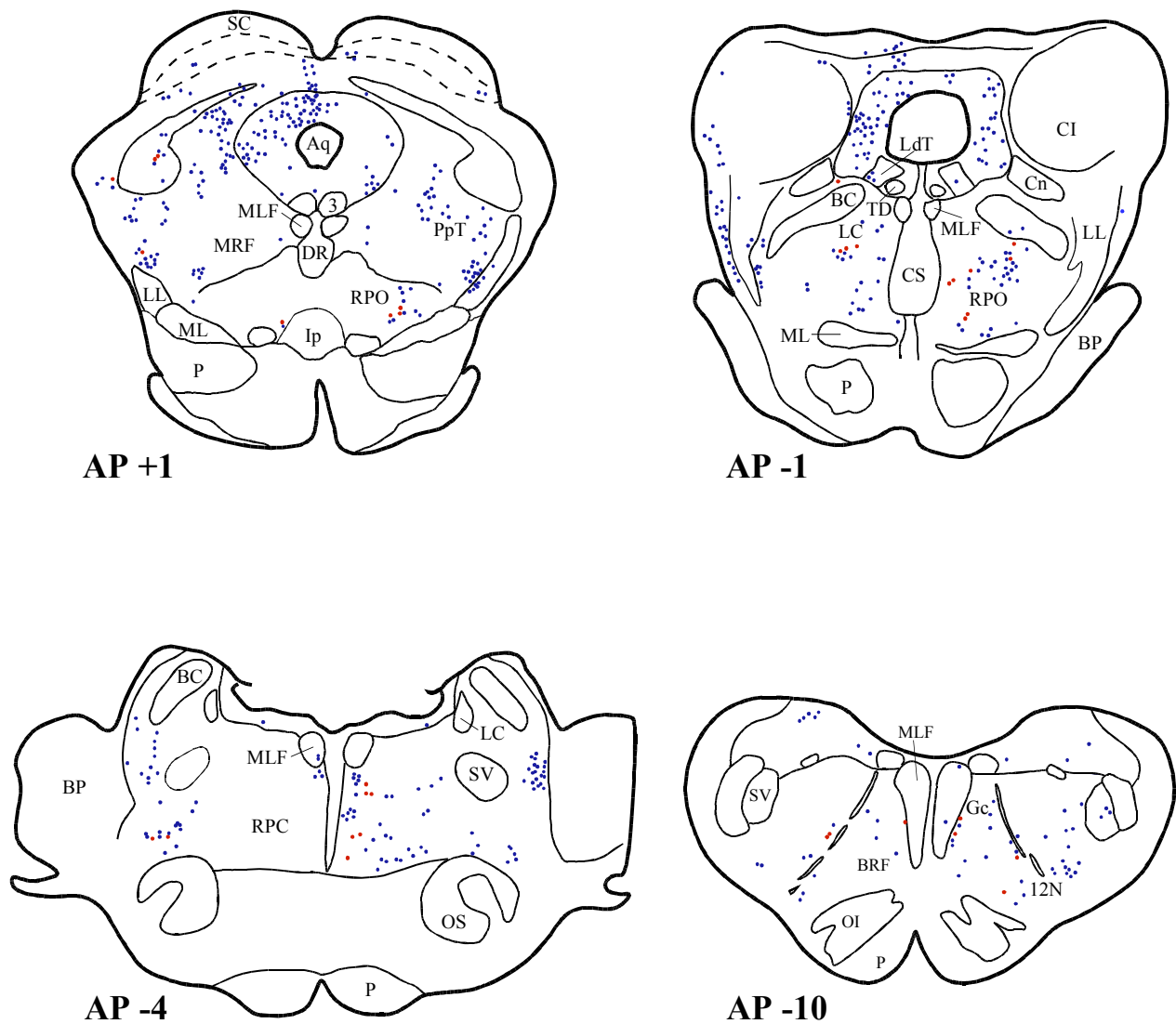


Figura 4.6.- Dibujos esquemáticos de secciones transversales del tronco del encéfalo del caso G-1352, desde niveles rostrales a caudales. Los puntos azules representan neuronas CTb-positivas y los puntos rojos representan neuronas CTb/GAD-positivas. Cada punto rojo representa una neurona; los puntos azules representan densidad de neuronas.



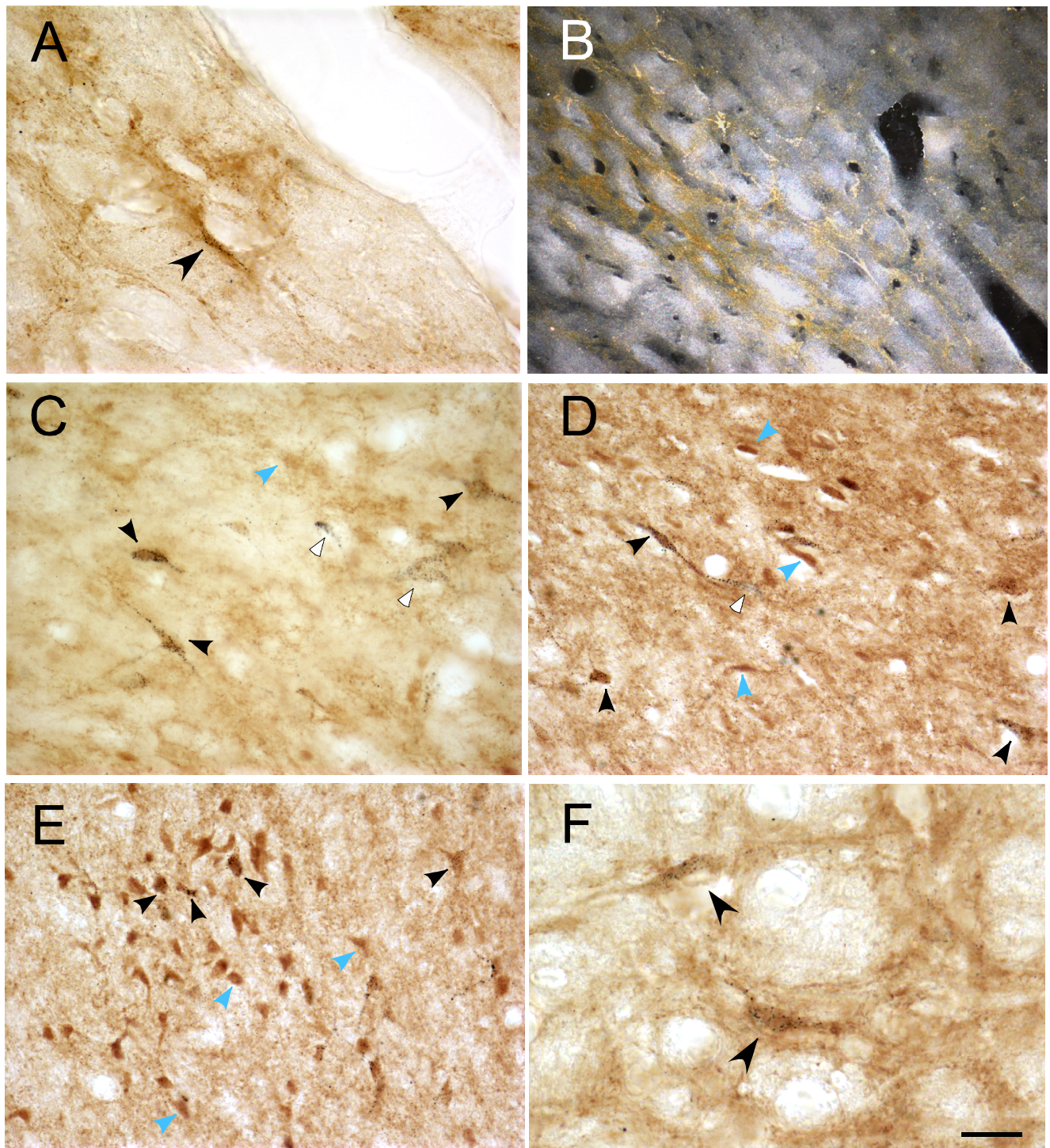


Figura 4.7.- Microfotografías del animal G-1352 donde se muestran ejemplos de neuronas CTb-positivas (flechas blancas), GAD-inmunopositivas (flechas azules) y doblemente marcadas (flechas negras) en el RT (A, B sobre campo oscuro), ZI (C), DH (D), DcH (E) y tegmento pontino (F). Barra de calibración: A, C, D=30 $\mu$ m; B= 100 $\mu$ m ; E= 40 $\mu$ m; F= 25 $\mu$ m.

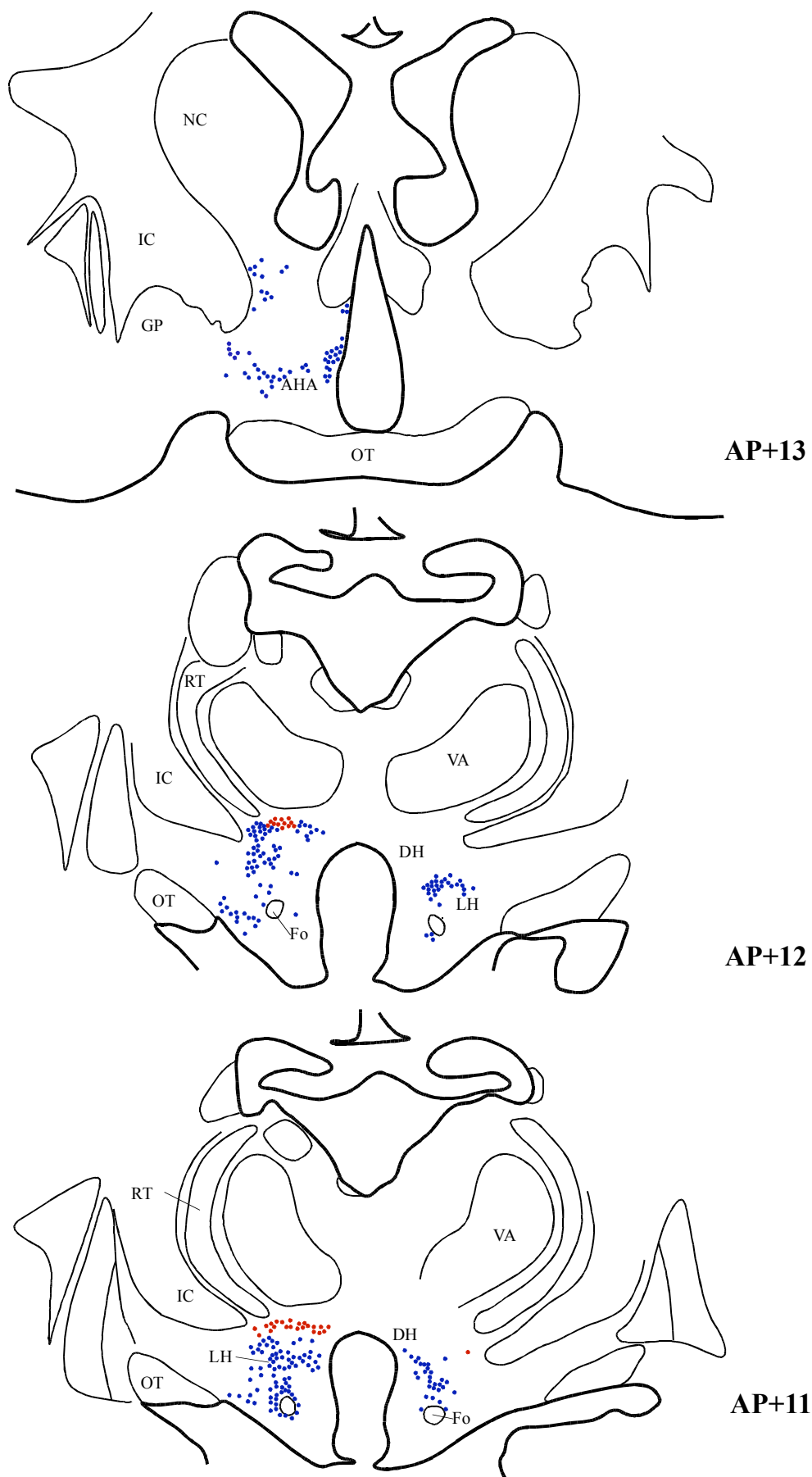


Figura 4.8.- Caso G-1337 (ver pie de figura en página siguiente).

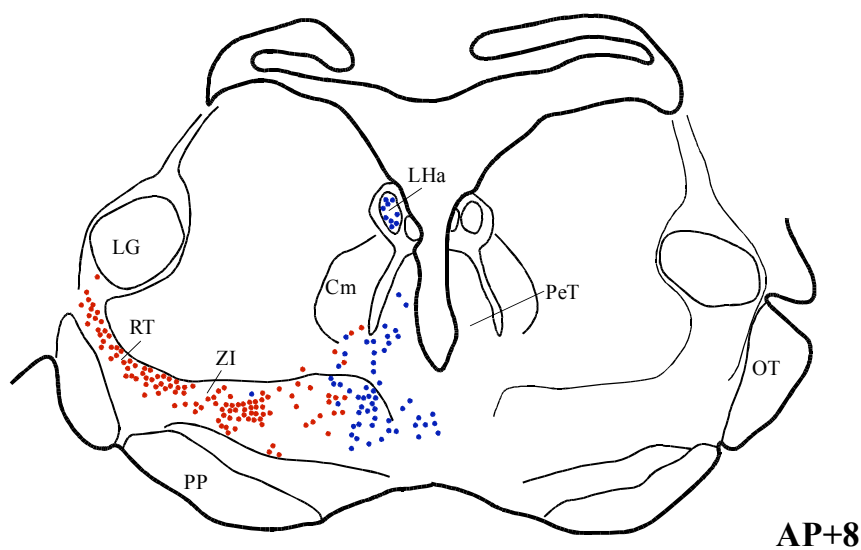
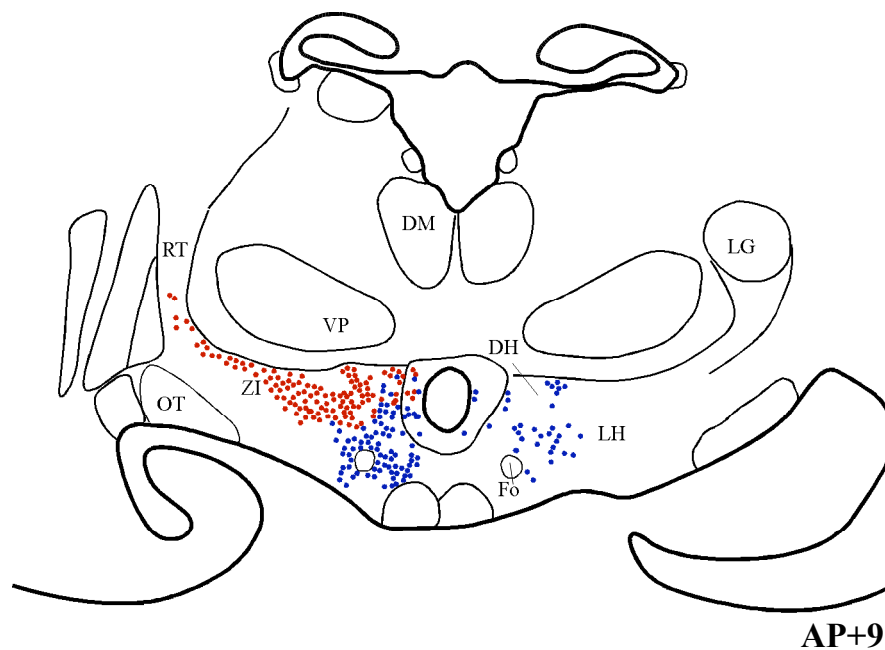


Figura 4.8 (continuación).- Dibujos esquemáticos de cortes transversales de prosencéfalo y tálamo, desde niveles rostrales a caudales, del caso G-1337. Los puntos azules representan neuronas marcadas positivamente con CTb. Los puntos rojos representan neuronas doblemente marcadas (CTb/GAD positivas). Cada punto rojo representa una neurona marcada. Los puntos azules representan densidad de neuronas.



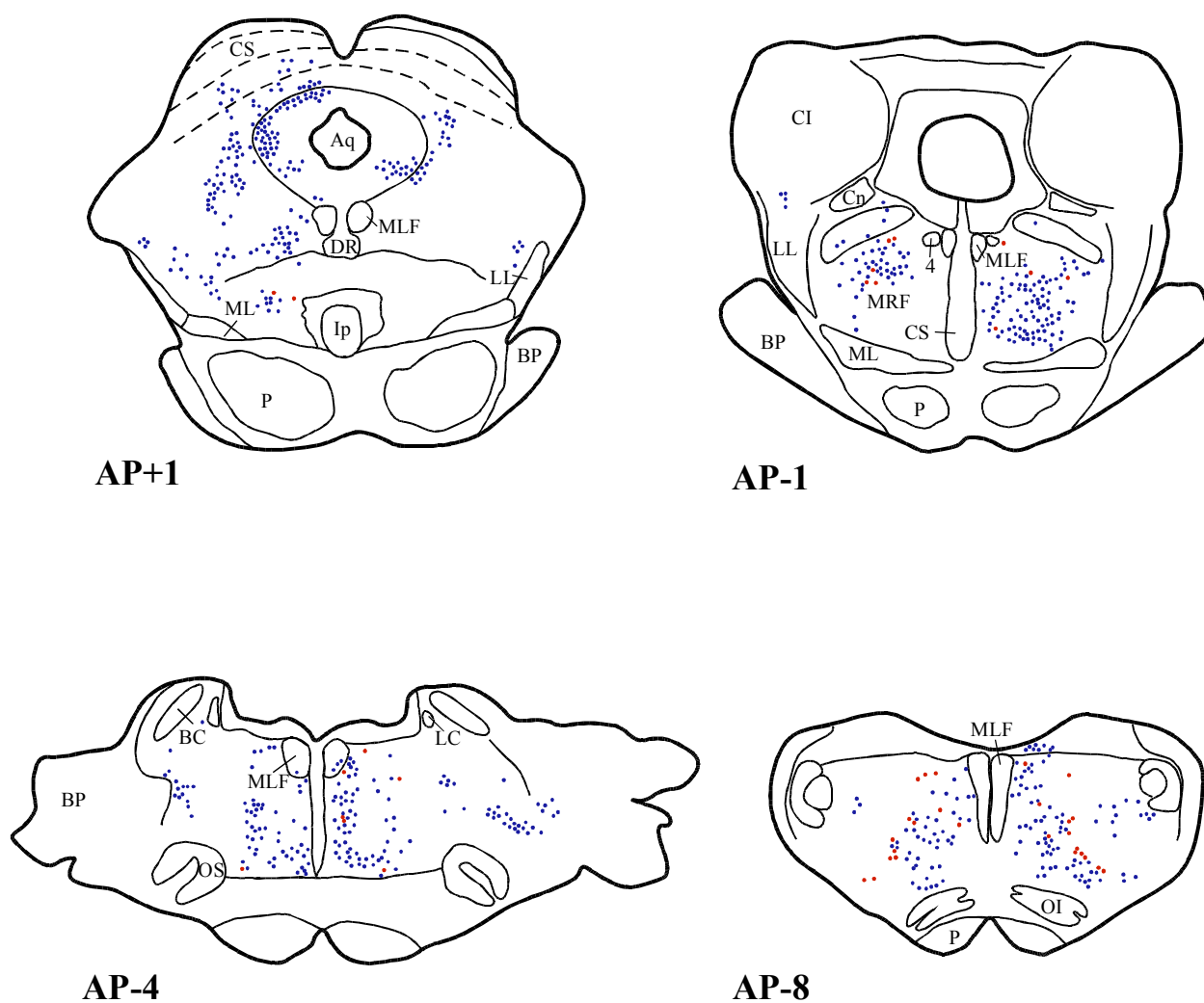


Figura 4.9.- Dibujos esquemáticos de secciones transversales del tronco del encéfalo del caso G-1337, desde niveles rostrales a caudales. Los puntos azules representan neuronas CTb-positivas y los puntos rojos representan neuronas CTb/GAD-positivas. Cada punto rojo representa una neurona; los puntos azules representan densidad de neuronas.

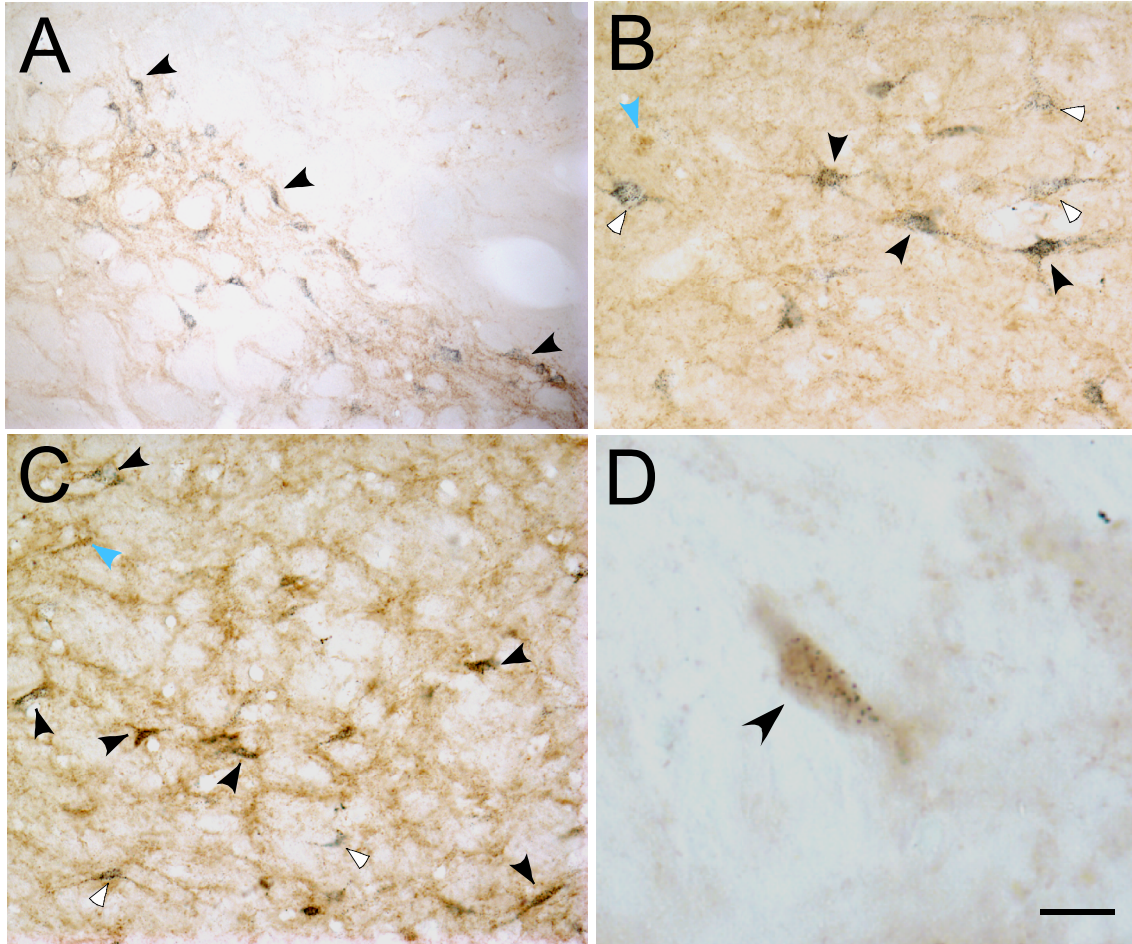


Figura 4.10.- Microfotografías del caso G-1337, donde se muestran ejemplos de neuronas CTb-positivas (flechas blancas), GABA-inmunopositivas (flechas azules) y doblemente marcadas (flechas negras) en el RT (A), ZI (B), vRPO contralateral (C) y RPC contralateral (D). Barra de calibración: A=100 $\mu$ m, B, C=80 $\mu$ m y D=30 $\mu$ m.



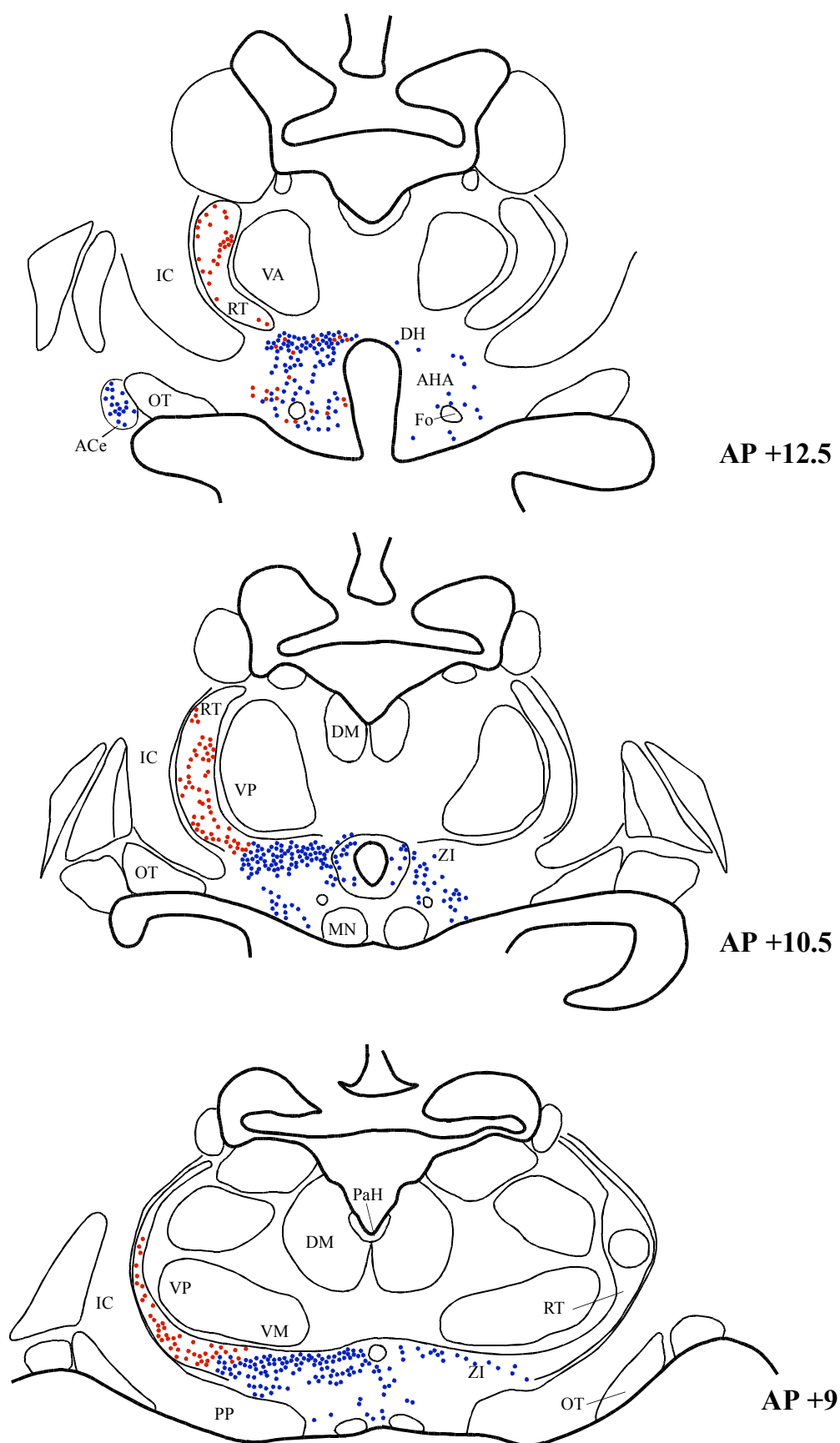


Figura 4.11.- Caso G-1336 (ver pie de figura en página siguiente).

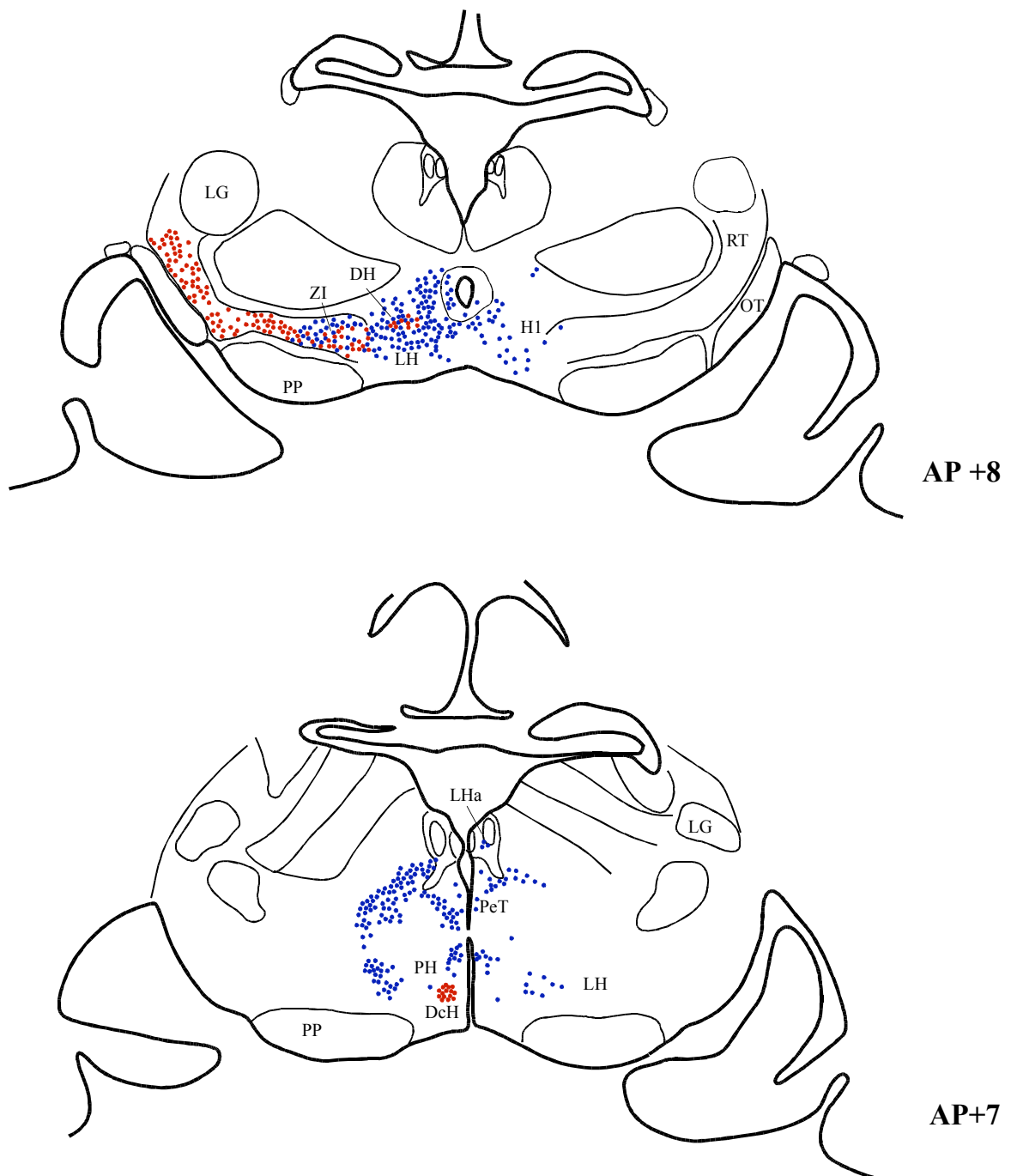
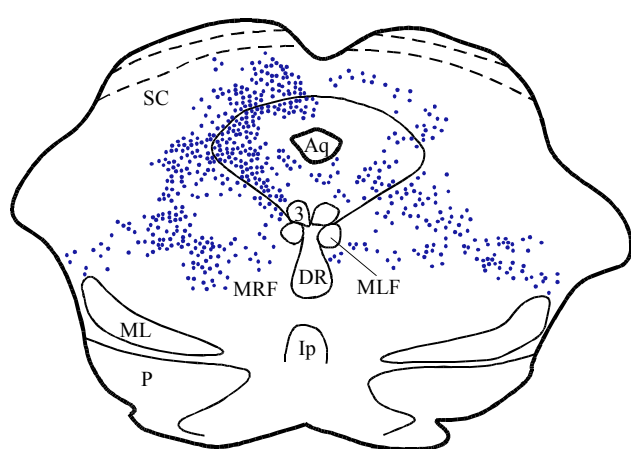
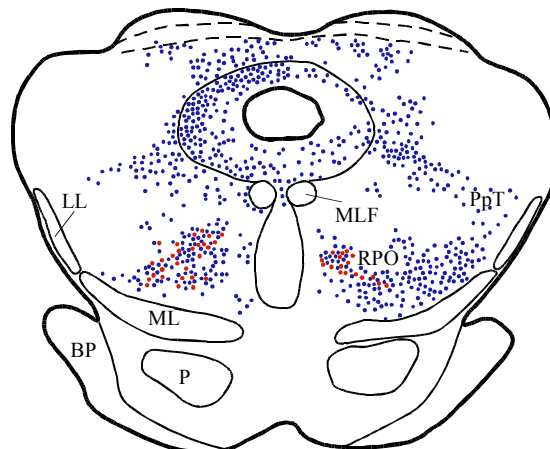


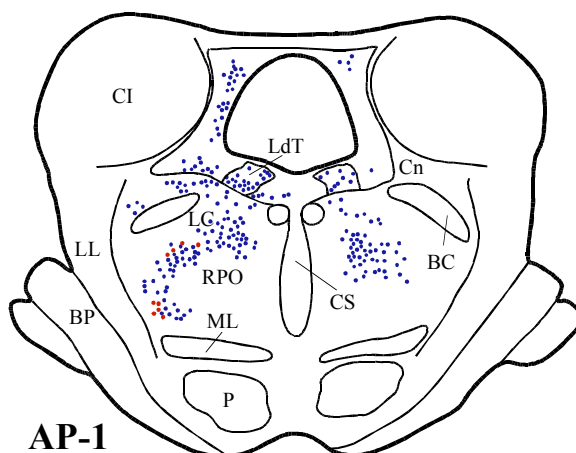
Figura 4.11 (continuación).- Dibujos esquemáticos de cortes transversales de prosencéfalo y tálamo, desde niveles rostrales a caudales, del caso G-1336. Los puntos azules representan neuronas marcadas positivamente con CTb. Los puntos rojos representan neuronas doblemente marcadas (CTb/GAD positivas). Cada punto rojo representa una neurona marcada. Los puntos azules representan densidad de neuronas.



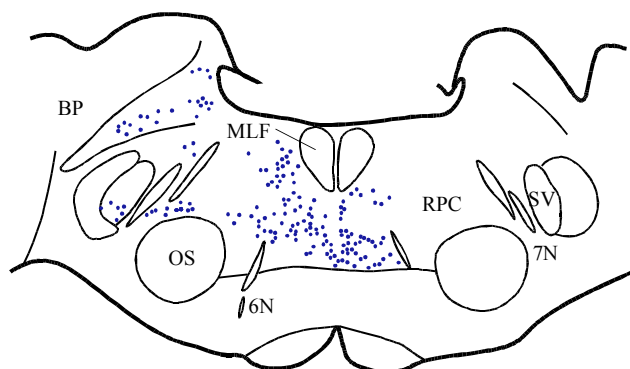
**AP+2**



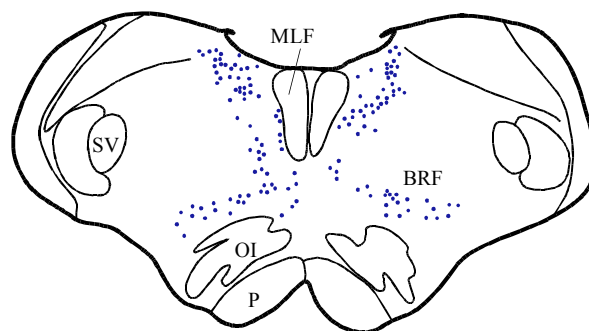
**AP+1**



**AP-1**



**AP-5**



**AP-9**

Figura 4.12.- Dibujos esquemáticos de secciones transversales del tronco del encéfalo del caso G-1336, desde niveles rostrales a caudales. Los puntos azules representan neuronas CTb-positivas y los puntos rojos representan neuronas CTb/GAD-positivas. Cada punto rojo representa una neurona; los puntos azules representan densidad de neuronas.

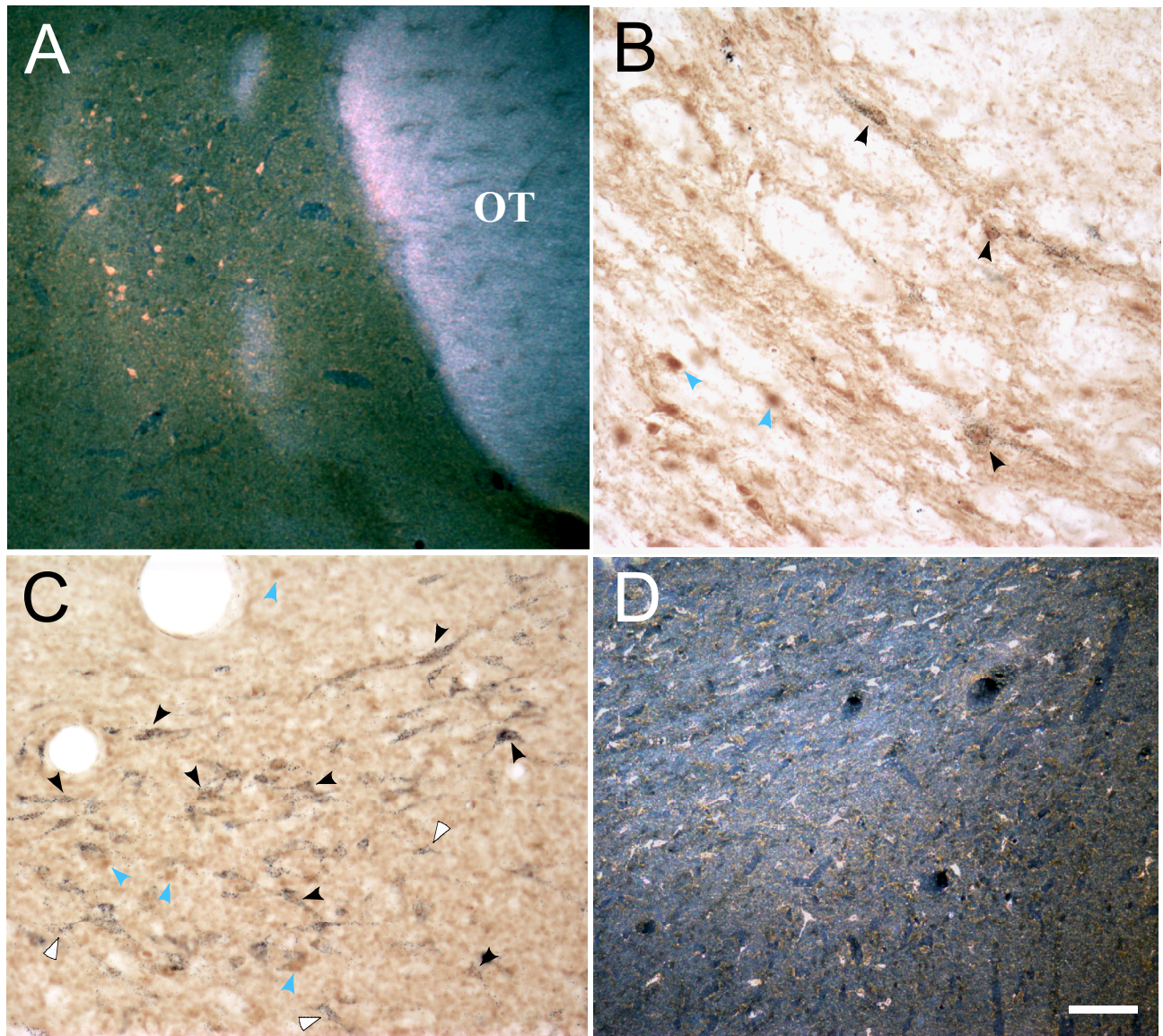
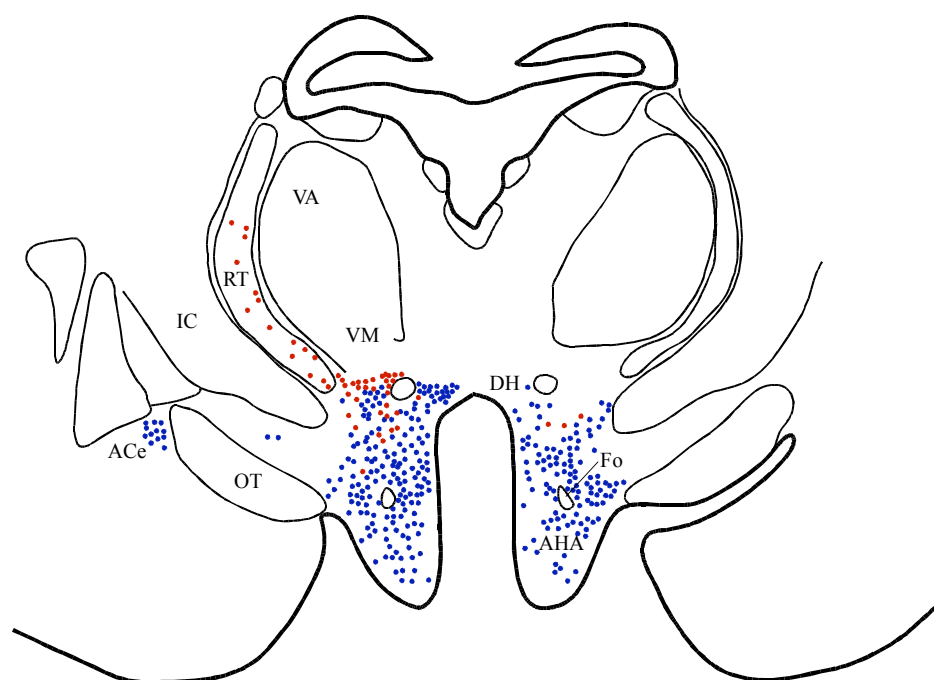
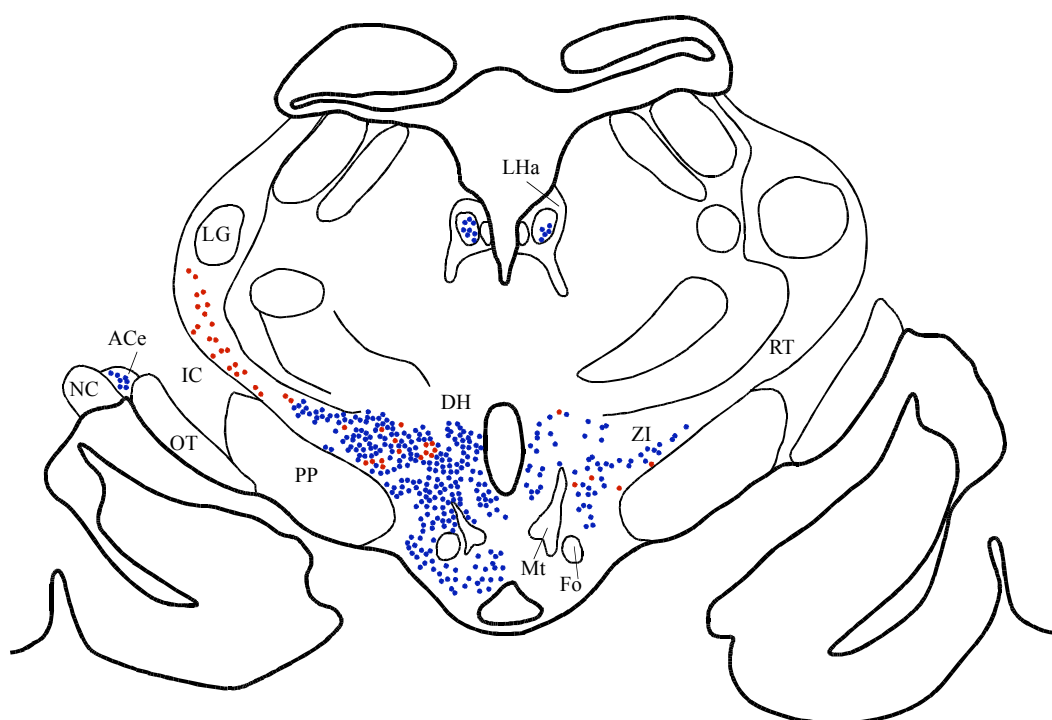


Figura 4.13- Microfotografías del caso G-1336 donde se muestran ejemplos de neuronas CTb-positivas (flechas blancas), GAD-inmunopositivas (flechas azules) y doblemente marcadas (flechas negras) en ACE bajo campo oscuro (A), RT (B), ZI (C) y DH bajo campo oscuro (D). Barra de calibración: A, D=230 $\mu$ m; B, C=80 $\mu$ m.





**AP +11**



**AP +9**

Figura 4.14.- Caso G-1365 (ver pie de figura en página siguiente).

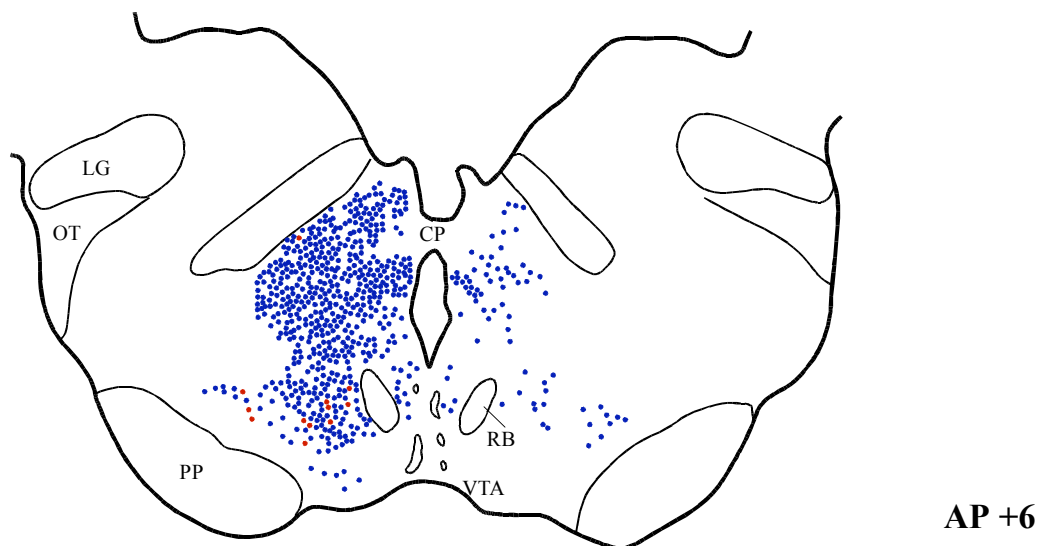
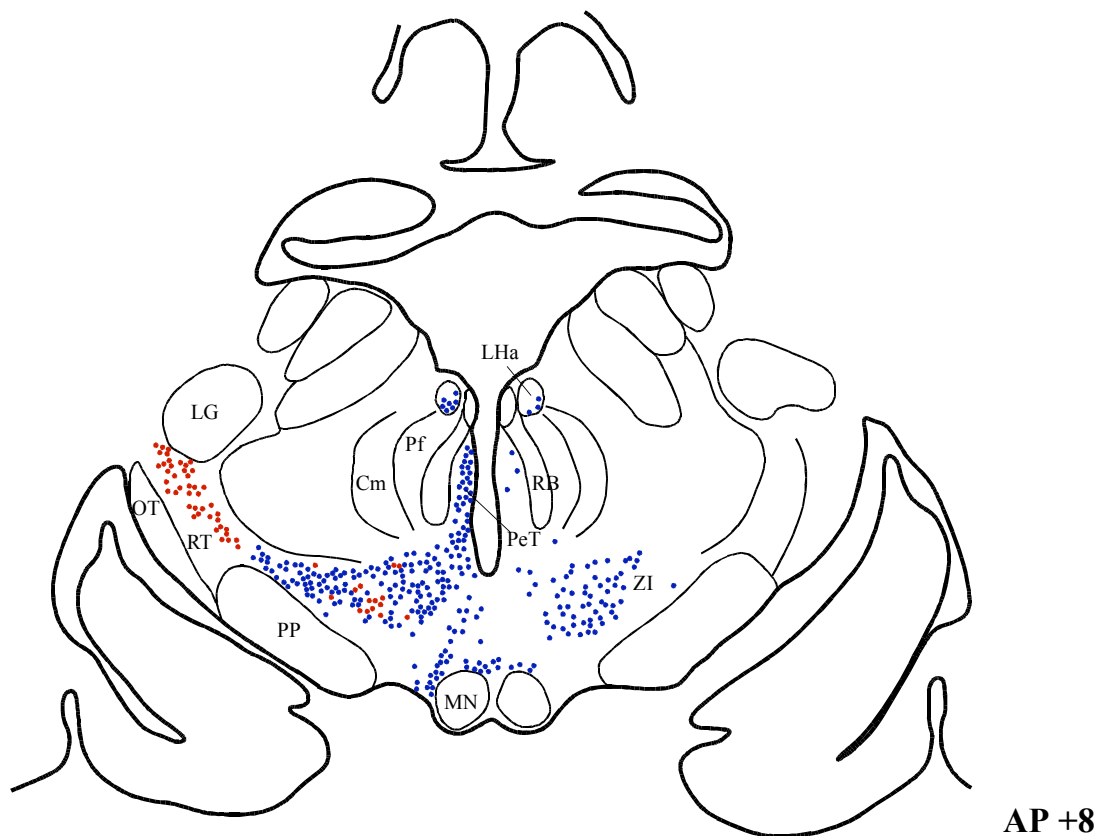
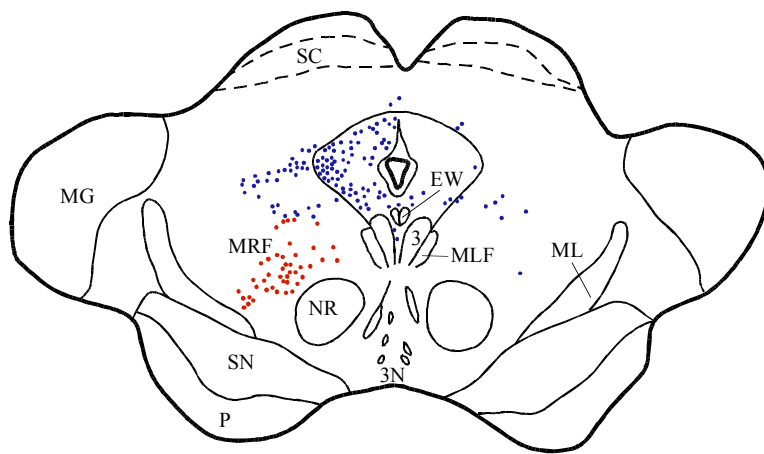
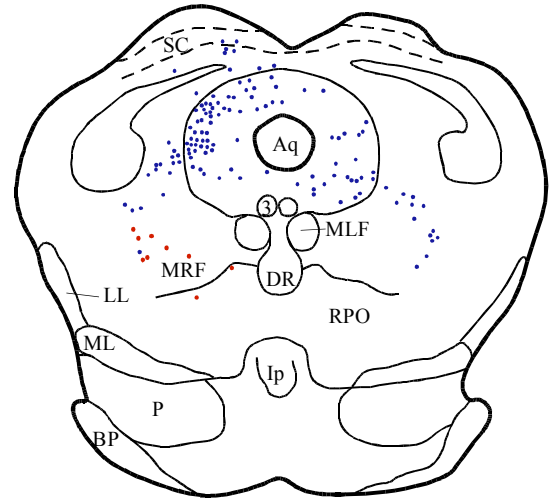


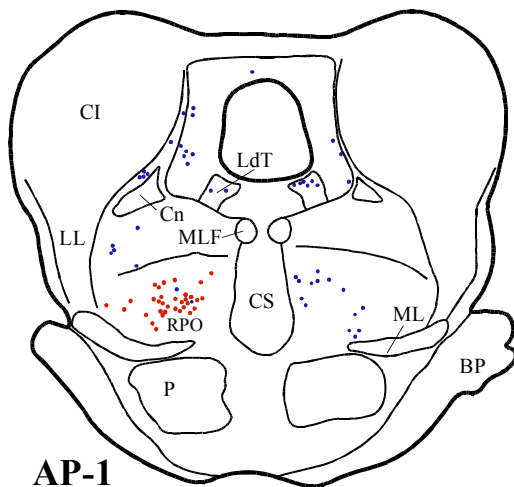
Fig 4.14 (continuación).- Dibujos esquemáticos de cortes transversales de prosencéfalo y tálamo, desde niveles rostrales a caudales, del caso G-1365. Los puntos azules representan neuronas marcadas positivamente con CTb. Los puntos rojos representan neuronas doblemente marcadas (CTb/GAD positivas). Cada punto rojo representa una neurona marcada. Los puntos azules representan densidad de neuronas.



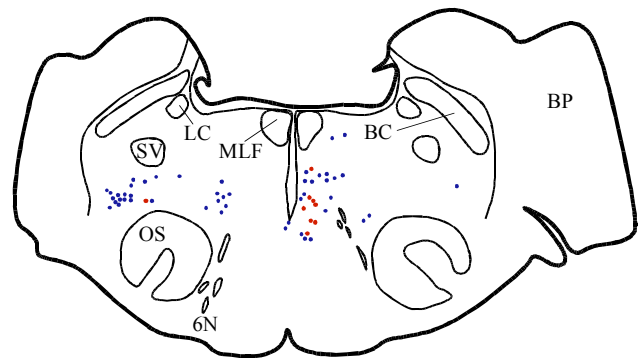
**AP+4**



**AP+1**



**AP-1**



**AP-4**

Figura 4-15.- Dibujos esquemáticos de secciones transversales del tronco del encéfalo del caso G-1365, desde niveles rostrales a caudales. Los puntos azules representan neuronas CTb-positivas y los puntos rojos representan neuronas CTb/GAD-positivas. Cada punto rojo representa una neurona; los puntos azules representan densidad de neuronas.

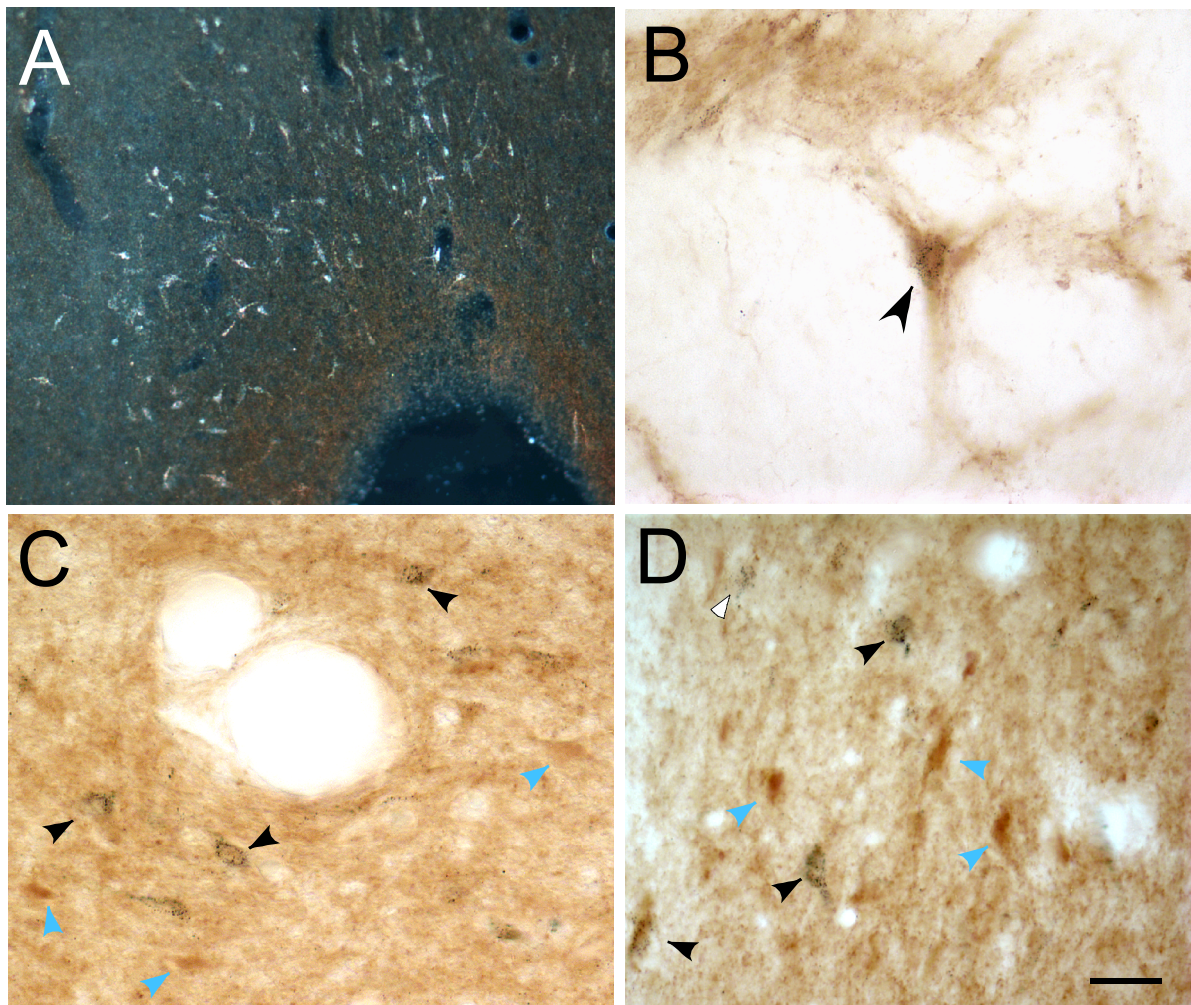


Figura 4.16.- Microfotografías del caso G-1365, donde se muestran ejemplos de neuronas CTb-positivas (flechas blancas), GABA-inmunopositivas (flechas azules) y doblemente marcadas (flechas negras) en prosencéfalo basal bajo campo oscuro (A), RT (B), ZI (C) y DH (D). Barra de calibración: A= 250 $\mu$ m, B= 25 $\mu$ m, C, D= 30 $\mu$ m



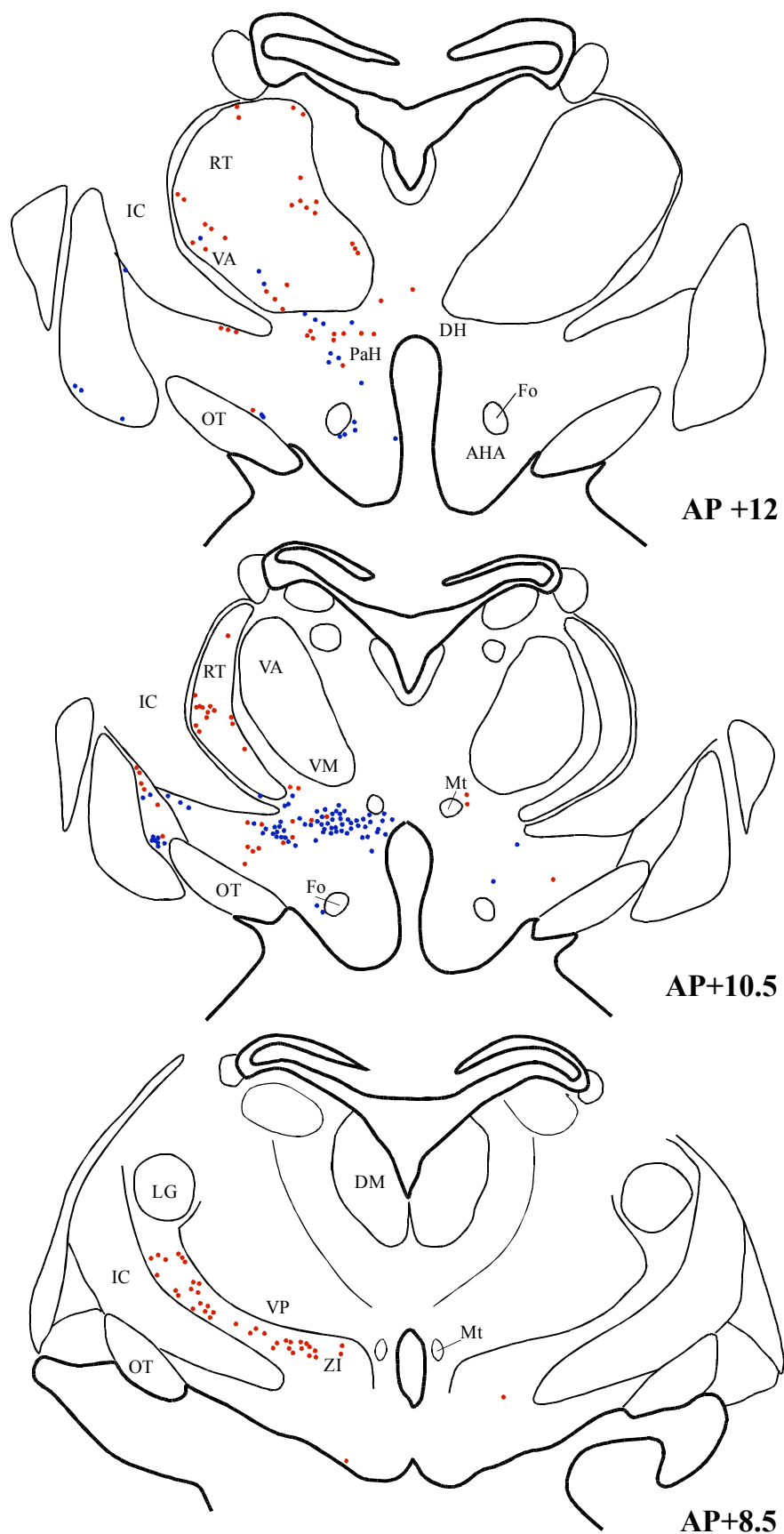


Figura 4.17.- Dibujos esquemáticos de cortes transversales del tálamo, desde niveles rostrales a caudales, del caso G-1317. Los puntos azules representan neuronas marcadas positivamente con CTb. Los puntos rojos representan neuronas doblemente marcadas (CTb/GAD positivas). Cada punto rojo representa una neurona marcada. Los puntos azules representan densidad de neuronas.

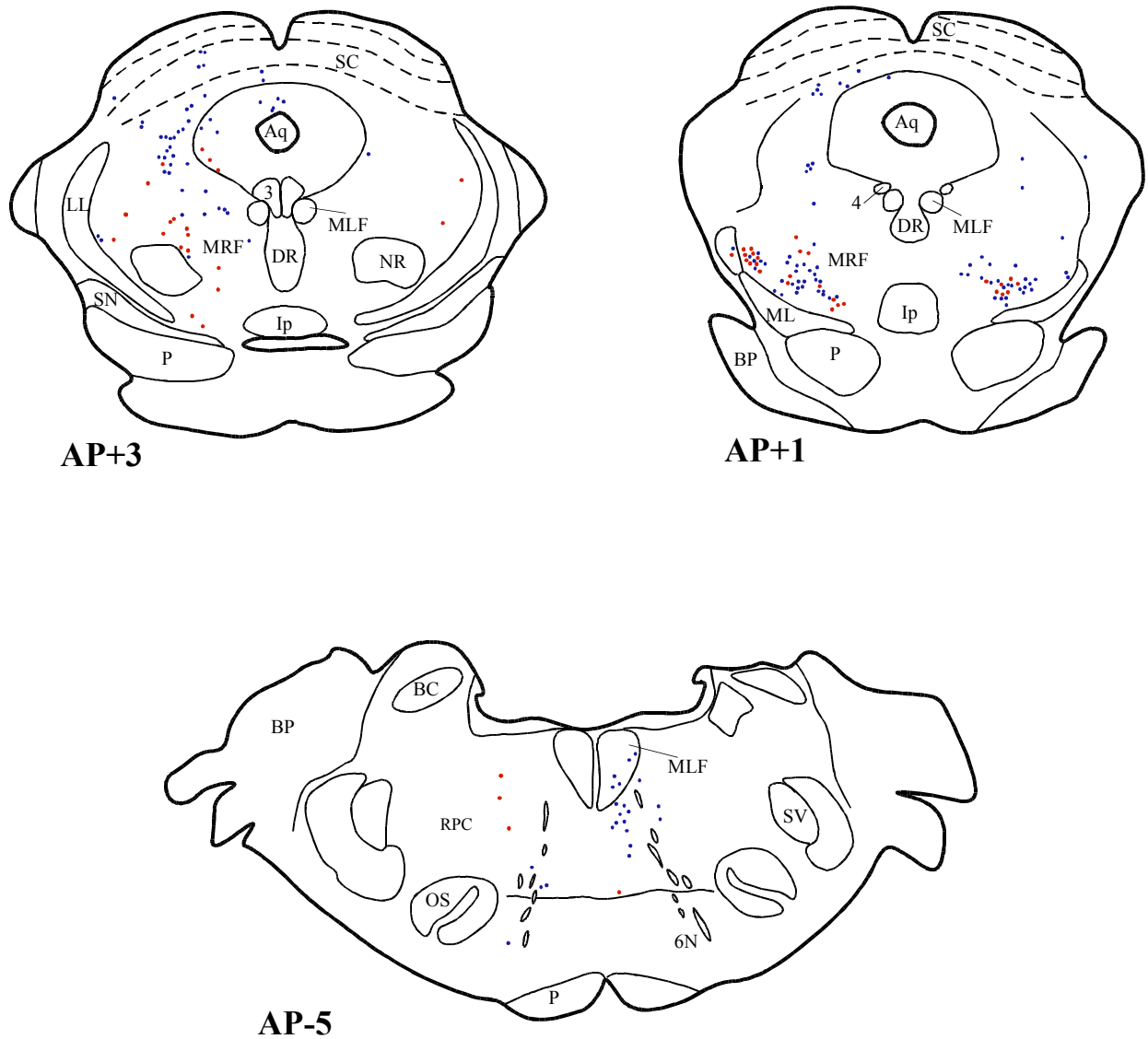


Figura 4.18.- Dibujos esquemáticos de secciones transversales del tronco del encéfalo del caso G-1317, desde niveles rostrales a caudales. Los puntos azules representan neuronas CTb-positivas y los puntos rojos representan neuronas CTb/GAD-positivas. Cada punto rojo representa una neurona; los puntos azules representan densidad de neuronas.

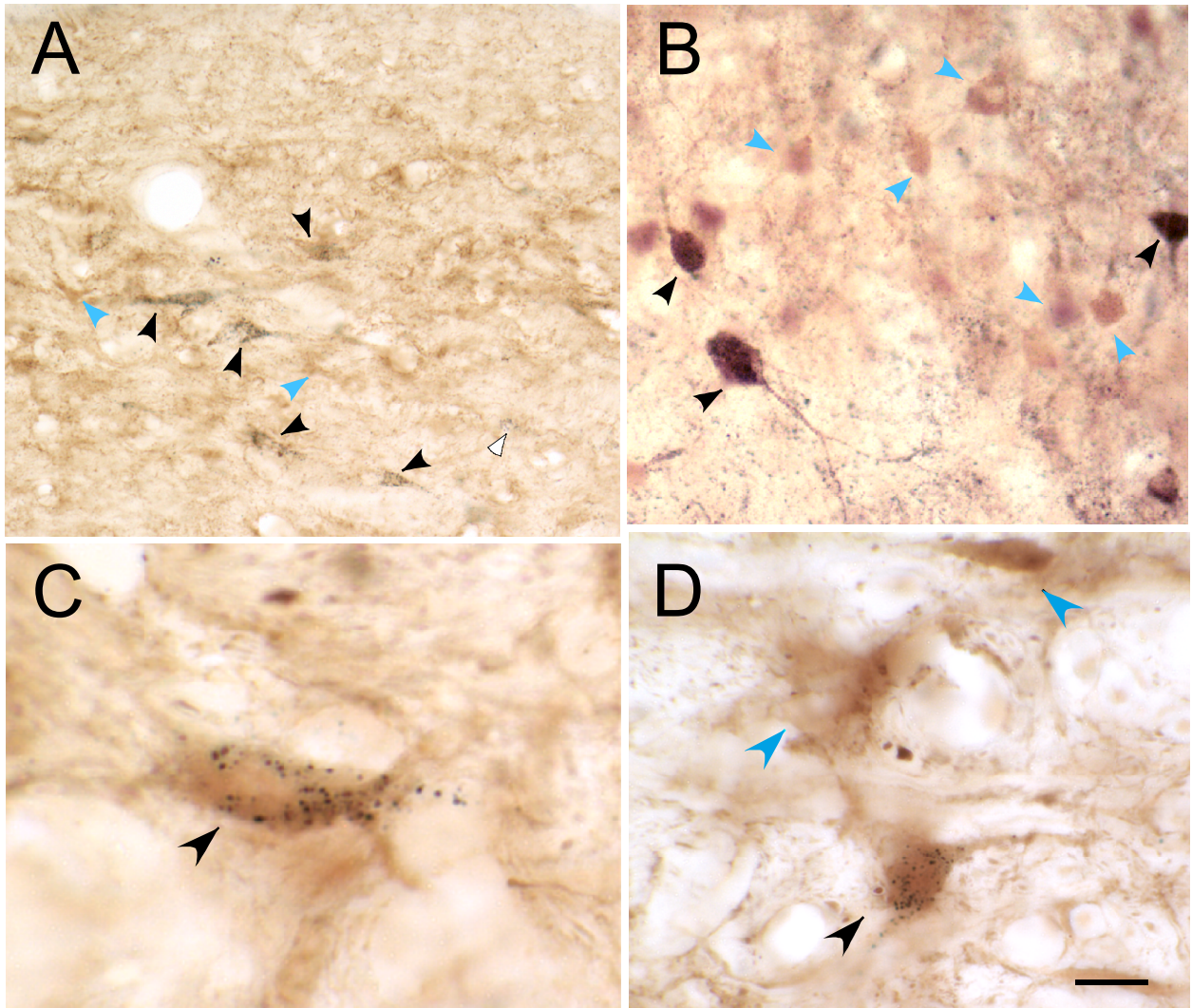


Figura 4.19.- Microfotografías del caso G-1317, donde se muestran ejemplos de neuronas CTb-positivas (flechas blancas), GAD-inmunopositivas (flechas azules) y doblemente marcadas (flechas negras) en ZI (A), PH (B) y RPC (C, D). Barra de calibración: A= 80 $\mu$ m , B y D = 60 $\mu$ m, C = 30 $\mu$ m.

		G1317	G1336	G1337	G1352	G1365	X±SD	%
	<b>Número de neuronas</b>							
<b>ZI</b>	CTb-positivas	248	272	275	233	281	261,8±20,41	
	CTb/GAD-positivas	56	38	41	75	27	47,4±18,58	
	Total	304	310	316	308	308	309,2±4,38	
	GABAérgicas							15,3
	no-GABAérgicas							84,7
<b>DH</b>	CTb-positivas	205	176	180	199	190	190,0±12,26	
	CTb/GAD-positivas	21	28	19	54	42	32,8±14,8	
	Total	226	204	199	253	232	222,8±21,94	
	GABAérgicas							14,7
	no-GABAérgicas							85,3
<b>LH</b>	CTb-positivas	176	212	158	153	133	166,4±29,73	
	CTb/GAD-positivas	18	62	20	43	22	33,0±19,07	
	Total	194	274	178	196	155	199,4±44,81	
	GABAérgicas							16,6
	no-GABAérgicas							83,4
<b>RT</b>	CTb-positivas							
	CTb/GAD-positivas	126	146	160	172	145	149,8±17,32	
	Total						149,8±17,32	
	GABAérgicas							100
	no-GABAérgicas							

Tabla 4.1.- Resultados del recuento de neuronas CTb-positivas y CTb/GAD-positivas en los 5 casos expresadas individualmente y en valores medios  $\pm$  SE, y en porcentajes de las neuronas GABAérgicas y no-GABAérgicas que proyectan al vRPO. Los datos que se muestran se refieren solo al lado ipsilateral ya que el número de neuronas CTb/GAD-positivas del lado contralateral no es relevante.

## *5. DISCUSIÓN*

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Consideraciones generales

Los resultados de nuestro trabajo nos han permitido demostrar la existencia de un patrón de conexiones GABAérgicas y/o no-GABAérgicas al vRPO desde estructuras que están situadas en el prosencéfalo basal, núcleo reticular del tálamo, hipotálamo y tronco del encéfalo y que están relacionadas con el control del CVS.

En los últimos 50 años se han llevado a cabo un gran número de estudios que han permitido demostrar que el tegmento pontino tiene un papel crítico en la generación y mantenimiento del sueño paradójico mediado por mecanismos colinérgicos (Hobson et al 1975, Baghdoyan et al 1984a, 1984b, 1987, Vanni-Mercier et al 1989, Reinoso-Suárez et al 1990, 1994, 2001, Yamamoto et al 1990, Jones 1991, Garzón et al 1998, Pace-Schott and Hobson 2002). El vRPO es la región del tegmento pontino oral donde la estimulación con agonistas colinérgicos induce, con muy corta latencia, episodios de sueño REM de larga duración con todas sus características electrofisiológicas y conductuales (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994, Garzón et al 1998). El hecho de que el vRPO se haya descrito como el organizador del sueño paradójico se debe también a que el estudio de sus conexiones aferentes y eferentes ha demostrado que está conectado con estructuras implicadas en la manifestación de cada uno de los eventos característicos del sueño REM: con la formación reticular pontomesencefálica y núcleo del tegmento pedunculopontino, que son responsable de la desincronización del EEG; con los núcleos para-abducens y prepósito del hipogloso y la formación reticular medial del puente, responsables de los movimientos oculares rápidos; con el núcleo del tegmento pedunculopontino, donde se generan las PGOs; con el tegmento pontino dorsolateral y núcleo bulbar magnocelular, donde se induce la atonía muscular; y con el propio núcleo reticular oral del puente, responsable del ritmo theta del hipocampo (Reinoso-Suárez et al 1994, De la Roza and Reinoso-Suárez 2000).

Trabajos previos de nuestro laboratorio, habían demostrado que el vRPO, también está relacionado anatómicamente con estructuras prosencefálicas responsables de las otras fases del CVS. En efecto, utilizando inyecciones de HRP-WGA, un trazador anterógrado y retrógrado, se ha visto que el vRPO está interconectado con el núcleo reticular del tálamo, que genera los husos de sueño, con la corteza cerebral, responsable de la sincronización del EEG durante sueño lento, y con el hipotálamo posterolateral, responsable de la vigilia (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994, 1999 ).

Por otra parte, la enorme implicación que tiene el diencefalo, tanto el tálamo como el hipotálamo, en el CVS ha sido ampliamente demostrada (Saper et al 2001, ver para referencias Marini and Mancía 1990). Los estudios realizados mediante lesiones electrolíticas o estimulación química han demostrado que las áreas laterales y posteriores del hipotálamo están implicadas en la vigilia (Lin et al 1989, Sakai et al 1990, Eisensehr et al 2003). El núcleo reticular del tálamo, en cambio, se considera como la estructura responsable de la generación de husos de sueño (Steriade et al 1987, Arcelli et al 1997, Reinoso-Suárez 1999, Reinoso-Suárez et al 2001), mientras que el núcleo dorsomedial del tálamo y el prosencéfalo basal tiene un papel importante en la organización del sueño de ondas lentas (Marini et al 1988, 1989, Spreafico et al 1990, De la Roza and Reinoso-Suárez 2000).

## **5.2 Las proyecciones GABAérgicas al vRPO**

En una publicación reciente donde se reporta un cuidadoso trabajo realizado con microscopía electrónica utilizando el método de “post-embedding” para detectar terminales GABAérgicas sobre las neuronas del vRPO, De la Roza y Reinoso-Suárez (2006) han sugerido la hipótesis de que las terminales GABAérgicas inhibitorias, que hacen contacto sináptico directamente sobre el soma o sobre diferentes sectores del árbol dendrítico, controlan de manera significativa la actividad de las neuronas del vRPO. Como consecuencia, los impulsos gabaérgicos podrían inhibir a las neuronas inductoras de sueño paradójico del vRPO durante los otros estados del CVS, la vigilia o el sueño lento (De la Roza and Reinoso-Suárez 2006).

### ***5.2.1. La proyección GABAérgica desde el núcleo reticular del tálamo***

La presencia de neuronas doblemente marcadas en el núcleo reticular del tálamo después de la inyección de CTb, nos ha permitido establecer que este núcleo es la principal fuente de las proyecciones GABAérgicas al vRPO desde una estructura diencefálica. Esta proyección desde el núcleo reticular del tálamo al vRPO es exclusivamente ipsilateral y se origina, preferentemente, en sus sectores rostrales y caudales infrageniculados.

De acuerdo con los estudios clásicos que se llevaron a cabo durante los años 70 en el gato, estaba establecido que el núcleo reticular de tálamo no proyectaba a estructuras situadas caudales al tálamo (Jones 1975). Los estudios realizados en rata utilizando el método del transporte retrógrado de la peroxidasa, también habían

cuestionado la existencia de conexiones desde el núcleo reticular del tálamo al tegmento pontino (Berry et al 1986); también en la rata, la tinción yuxtacelular de neuronas individuales del núcleo reticular del tálamo muestra que las arborizaciones terminales de los axones de estas células se restringen a núcleos concretos del tálamo (Pinault and Deschênes 1998). Sin embargo, por medio del trazado neuronal de la peroxidasa, se han descrito en el gato conexiones desde el núcleo reticular del tálamo y otras estructuras subtalámicas, tales como la zona incerta, el núcleo geniculado lateral ventral y el hipotálamo posterolateral, a estructuras del tronco del encéfalo, concretamente al colículo superior, a la sustancia gris periacueductal y a la formación reticular mesencefálica (Grofovà et al 1978, Edwards et al 1979, Tortelly and Reinoso-Suárez 1980; Tortelly et al 1980). En trabajos posteriores realizados en nuestro laboratorio se habían descrito en el núcleo reticular del tálamo neuronas marcadas retrógradamente por la peroxidasa después de inyecciones de este trazador en el vRPO (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994), aunque no se había demostrado la naturaleza GABAérgica de esta proyección. Los resultados del presente trabajo confirman los obtenidos en trabajos anteriores y demuestran que la proyección desde el núcleo reticular del tálamo al vRPO es obviamente GABAérgica, ya que todas las neuronas de este núcleo son de esta naturaleza bioquímica (Jones 1975, Oertel et al 1983). Hasta donde hemos revisado la literatura, esta es la primera descripción de una proyección GABAérgica desde el núcleo reticular del tálamo al tegmento pontino y concretamente al área inductora de sueño paradójico en el gato.

El núcleo reticular del tálamo está considerado como el responsable de la génesis de los husos de sueño, una significativa característica bioeléctrica del estado de sueño lento (Steriade et al 1987, Arcelli et al 1997, Reinoso-Suárez et al 2001). Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la proyección GABAérgica de las neuronas del núcleo reticular del tálamo al vRPO, podría contribuir a suprimir la inducción del sueño paradójico durante el estado de sueño lento.

### ***5.2.2 La proyección GABAérgica desde otras estructuras talámicas***

El núcleo reticular del tálamo se continúa en sus porciones caudales y mediales, sin solución de continuidad, con la zona incerta. El vRPO recibe también conexiones GABAérgicas desde la zona incerta; en este caso la conexión es consistente, sobre todo desde las porciones mas cercanas a la línea media y preferentemente ipsilateral. Solo una proporción de esta conexión desde la zona incerta es GABAérgica, las neuronas



CTb-positivas son muy numerosas comparadas con las doblemente marcadas, por lo que la proyección GABAérgica al vRPO desde la zona incerta no es grande aunque tiene su origen en todos sus sectores. La zona incerta, que está situada en una zona donde se entrecruzan los axones de los grandes tractos ascendentes y descendentes, tiene el mismo origen embrionario que el núcleo reticular del tálamo (Reinoso-Suárez 1966) por lo que a la proyección GABAérgica de la zona incerta al vRPO se le podría atribuir una función semejante a la del núcleo reticular del tálamo. En la rata, se ha demostrado que la actividad de ciertos núcleos talámicos está regulada por la inhibición que ejercen sobre ellos las neuronas GABAérgicas de la zona incerta, y que esta inhibición puede ser suprimida por los impulsos colinérgicos procedentes del sistema reticular ascendente de activación (Trageser et al 2006); los impulsos ascendentes procedentes de los núcleos colinérgicos del tegmento laterodorsal y pedunculopontino, que actúan durante la vigilia y el sueño paradójico, suprimen los mecanismos inhibitorios que ejerce la zona incerta sobre los núcleos talámicos de proyección tálamo-cortical durante el sueño no-REM (Masri et al 2006). De acuerdo con estos datos, las neuronas GABAérgicas de la zona incerta podrían también ejercer un mecanismo semejante para inhibir a las neuronas del vRPO durante el sueño no-REM en el gato.

Solo hay una débil proyección al vRPO desde otros núcleos talámicos, como LO núcleo lateral de la habénula, centromediano, parafascicular y el núcleo periventricular, de la que es difícil conocer su significado.

### ***5.2.3 La proyección GABAérgicas desde estructuras hipotalámicas***

Nuestros resultados muestran que la proyección GABAérgica al vRPO desde estructuras hipotalámicas no es especialmente abundante, es principalmente ipsilateral y está restringida a determinadas estructuras; en efecto, hemos encontrado que la estructura desde donde se origina la proyección mas importante al vRPO es el área hipotalámica dorsal, mientras que las áreas hipotalámicas lateral y posterior, el campo H1 de Forel y el área perifornical son el origen de una proyección hipotalámica mucho mas discreta al vRPO; hay que añadir, además, una importante proyección GABAérgica desde el núcleo hipotalámico dorsocaudal al vRPO.

Tanto el área hipotalámica dorsal como el área hipotalámica lateral han estado siempre relacionadas con el mantenimiento del estado de vigilia fisiológica, y una gran proporción de sus neuronas presenta el máximo de su actividad durante esa fase del

CVS (Lin 2000, Saper et al 2001, 2005, Sutcliffe and de Lecea 2002, Koyama et al 2003). Las neuronas GABAérgicas que hemos descrito en diferentes estructuras hipotalámicas, donde se incluyen las áreas hipotalámicas dorsal y lateral, pueden ser el origen de una proyección que ejerza un efecto inhibitor sobre las neuronas del vRPO durante la fase de vigilia.

El análisis cuantitativo de nuestros hallazgos indica que el 14.7% de las neuronas del área hipotalámica dorsal y el 16.6% de las del área hipotalámica lateral que proyectan al vRPO, son GABAérgicas. Estos resultados pueden ofrecer una explicación a los hallazgos obtenidos con microscopía electrónica por De la Roza et al (2004): después de inyecciones del transportador anterógrado dextrano amino-biotinilado en las áreas hipotalámicas dorsal y lateral, seguido de un procesamiento inmunocitoquímico y una cuantificación estereológica, estos autores dejan establecido que, aproximadamente, un 26% de las terminales marcadas por el trazador anterógrado sobre las neuronas del vRPO son GABAérgicas y establecen con ellas sinapsis simétricas. Nuestros resultados están también de acuerdo con la hipótesis que plantean de De la Roza et al (2004), según la cual la activación de una proyección GABAérgica descendente desde estructuras hipotalámicas podría inhibir a las neuronas del vRPO y contribuir de esta manera a la supresión, durante la vigilia, del sueño paradójico inducido por las neuronas del vRPO (De la Roza et al 2004).

En este trabajo, describimos por primera vez un núcleo GABAérgico en el hipotálamo del gato. En la parte caudal y dorsal del hipotálamo junto a la luz del tercer ventrículo, hemos localizado un grupo bien definido de neuronas pequeñas y redondeadas, teñidas muy intensamente para la reacción inmunocitoquímica de GAD. Este conjunto de células está descrito en el atlas del hipotálamo del gato de Avendaño y Reinoso-Suárez (1975), como núcleo hipotalámico dorsocaudal. No hemos encontrado en la literatura que hemos revisado ninguna descripción actualizada de este núcleo, pero hemos podido constatar que desde las neuronas de este bien definido núcleo GABAérgico se origina una proyección bilateral muy consistente al vRPO; es de señalar que todas las neuronas que describimos en este núcleo están doblemente marcadas, no hay ninguna neurona CTb-positiva, por lo que la proyección que se origina desde esta estructura al vRPO es exclusivamente GABAérgica. Aunque el papel fisiológico de este núcleo está por dilucidar, parece estar relacionado con estructuras hipotalámicas vigilantígenas; en este caso, el efecto inhibitorio de la

proyección gabaérgica del núcleo hipotalámico dorsocaudal sobre las neuronas del vRPO podría contribuir a suprimir la inducción de sueño paradójico durante la vigilia.

Otras estructuras hipotalámicas, tales como el núcleo hipotalámico paraventricular, el área perifornical y el campo H1 de Forel deben participar de una manera más limitada en este patrón descendente de influencia inhibitoria, ya que son muy pocas las neuronas GABAérgicas que desde estas estructuras proyectan al vRPO.

#### **5.2.4 La proyección GABAérgica desde estructuras troncoencefálicas**

La presencia del GABA en el vRPO se ha podido deducir gracias a los experimentos llevados a cabo *in vivo* con microdiálisis que confirman la existencia de transportadores funcionales de GABA en el vRPO y su modificación por la administración de morfina (Watson et al 2007). Neuronas y/o terminales GABA-inmunoreactivas en el vRPO también se han descrito con microscopía óptica y electrónica; el marcaje con inmunoperoxidasa demuestra que solo hay unos pocos somas neuronales de pequeño tamaño inmunoreactivos a GABA dispersos en el vRPO (Mugnaini and Oertel 1985, Ford et al 1995, De la Roza and Reinoso-Suárez 2000, 2003). Estas neuronas deben ser interneuronas locales y el origen de algunas de las terminales marcadas con GABA sobre las propias neuronas del vRPO descritas en el trabajo de De la Roza and Reinoso-Suárez (2006), aunque también podrían proyectar a estructuras mas distantes, como el hipotálamo, donde inhibirían a neuronas que están activas durante la vigilia y el sueño lento (Ford et al 1995, Verret et al 2003).

Las neuronas GABAérgicas se encuentran distribuidas en una gran cantidad por todo el neuropilo del tronco del encéfalo tanto en gato como en rata (Kosaka et al 1987, Jones 1991, Ford et al 1995, Sapin et al 2009, Wang and Morales 2009). La activación de las neuronas GABAérgicas de la formación reticular del puente se considera un fenómeno esencial para desencadenar el sueño paradójico; aunque se ignora la razón de la activación de estas células GABAérgicas, se ha propuesto que la liberación de GABA en el locus coeruleus y en los núcleos del rafe provoca la inhibición de las neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas, así como la activación (o desinhibición) de neuronas colinérgicas del tegmento mesopontino, durante el sueño paradójico (Nitz and Siegel 1997a, 1997b). Por otra parte, Maloney et al (2000) han encontrado que el número de células GABAérgicas en el núcleo pontino oral de la rata que expresan *fos*, desciende durante el rebote de sueño paradójico consecuente a su privación, lo que sugiere que las neuronas GABAérgicas de esta estructura están

activas durante la vigilia y el sueño lento, e inactivas durante sueño paradójico (Maloney et al 2000).

Sin embargo, en nuestro trabajo hemos encontrado que las neuronas GABAérgicas que proyectan al vRPO son pocas y están dispersas por la formación reticular mesencefálica, pontina (incluyendo el vRPO contralateral) y bulbar. Las técnicas que combinan el trazador retrógrado CTb con la inmunocitoquímica contra GAD, han demostrado que la inervación GABAérgica al núcleo sublaterodorsal de la rata provienen tanto de interneuronas como de neuronas mas distantes localizadas en la formación reticular mesencefálica y pontina (Boissard et al 2003). Por otra parte, estos mismos autores, realizando trabajos cuidadosos donde se combina la detección inmunohistoquímica de *fos* con la hibridización *in situ* no-radioactiva de GAD mRNA en ratas privadas de sueño paradójico, han visto neuronas GABAérgicas que impiden el sueño paradójico localizadas principalmente en la parte ventrolateral de la sustancia gris periacueductal y en la parte dorsal del núcleo reticular mesencefálico inmediatamente subyacente (Sapin et al 2009). Estos autores encontraron también una gran cantidad de neuronas GABAérgicas generadoras de sueño paradójico en el núcleo reticular bulbar, que se sabe participa en la organización de la atonía muscular característica del sueño paradójico; en cambio las neuronas generadoras de sueño paradójico localizadas en el núcleo sublaterodorsal, no son GABAérgicas (Sapin et al 2009). Todos estos resultados indican que, al menos en la rata, puede haber poblaciones de neuronas GABAérgicas que generan sueño paradójico distribuidas por el tronco del encéfalo, así como otras que detiene su aparición y que el posible papel que desempeñan ambos tipos de poblaciones está por elucidar.

En el presente trabajo en el gato, hemos localizado neuronas GABAérgicas que proyectan al vRPO en la formación reticular mesencefálica, pontina y bulbar. Sin embargo, el papel de estas neuronas GABAérgicas en la generación del sueño REM en gato puede no ser equivalente al de los anteriormente descritos para rata, puesto que las características del sueño REM en la rata son muy diferentes a las del gato.

### 5.3 Las proyecciones no-GABAérgicas al vRPO

En un amplio estudio centrado en la detección de las proyecciones al vRPO en el gato utilizando el método de inyección del trazador neuronal retrógrado, la HRP, ya habíamos constatado que esta región recibe importantes conexiones aferentes desde numerosas estructuras: la corteza frontal, la banda diagonal de Broca, el área preóptica

lateral, el núcleo reticular y los núcleos intralaminares del tálamo, el núcleo de la habénula lateral, la zona incerta, el hipotálamo lateral, medial y dorsal, la región pretectal, las capas profundas del colículo superior, la sustancia gris central, la formación reticular mesencefálica, la región retrorubral, el campo tegmental ventral paralemniscal, los núcleos del tegmento laterodorsal y pedunculopontino, el complejo del locus coeruleus, los núcleos reticular oral y caudal del puente, los núcleos para-abducens y prepósito del hipogloso, y los núcleos reticulares bulbares magnocelular, gigantocelular y parvocelular (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994). Cuando se ha estudiado la naturaleza bioquímica de algunas de estas proyecciones se ha podido demostrar que el vRPO recibe abundantes conexiones serotoninérgicas desde el tegmento mesopontino, aunque escasas desde los núcleos del rafe (Kobayashi et al 1994, Rodrigo-Angulo et al 2000); el vRPO está también innervado por las neuronas de los núcleos colinérgicos mesopontinos, así como por el complejo del locus coeruleus y los núcleos parabraquiales (Rodrigo-Angulo et al 2005). Los datos del presente trabajo utilizando la CTb como trazador, confirman los hallazgos anteriores ya que las neuronas CTb-positivas también se localizan en las estructuras mencionadas anteriormente. Sin embargo, solo habíamos prestado atención a las conexiones del vRPO con estructuras relacionadas con los diferentes signos del sueño paradójico o con las relacionadas con otras fases del CVS; por tanto, discutimos ahora el posible papel que otras estructuras juegan en la modulación del sueño paradójico.

### ***5.3.1 La proyección no-GABAérgica desde estructuras prosencefálicas***

El vRPO recibe una importante proyección no-GABAérgica desde el núcleo central de la amígdala ipsilateral, desde las porciones lateral y medial del núcleo del lecho de la estría terminal, desde el núcleo preóptico mediano y desde el área preóptica medial.

Jongen-Rêlo and Amaral (1998) han encontrado que, en el mono, hay una población neuronal GABAérgica en el núcleo central de la amígdala que proyecta a núcleos del tronco del encéfalo que están implicados en funciones autonómicas; sin embargo, no hemos encontrado en la literatura ninguna referencia a la naturaleza GABAérgica de estas neuronas amigdalinas en el gato, y nosotros tampoco hemos podido detectar ninguna neurona GAD-positiva en el núcleo central de la amígdala en ninguno de nuestros casos. En cambio, sí se han descrito proyecciones no-GABAérgicas tanto desde el núcleo central de la amígdala como desde el núcleo del

lecho de la estría terminal al núcleo sublaterodorsal del tronco del encéfalo, que se considera está implicado en la organización del sueño paradójico en la rata (Jongen-Rêlo and Amaral 1998, Boissard et al 2003). Además de haberse descrito una importante proyección desde el núcleo central de la amígdala hasta el tronco del encéfalo, la implicación del complejo amigdalino y, específicamente, del núcleo central de la amígdala, en la regulación del sueño REM, es bien conocida; los estudios de electrofisiología han demostrado que el núcleo central de la amígdala descarga de forma espontánea durante el sueño REM, cuando se estimula eléctricamente se produce un aumento de sueño REM, y cuando se inhibe su actividad con antagonistas colinérgicos se produce una disminución de sueño REM (Sandford et al 2002, 2006). Todos estos datos, junto con nuestros resultados sugieren que la amígdala, bien directamente, o a través de los núcleos del lecho de la estría terminal, tienen una activa influencia sobre la modulación del sueño paradójico inducido por las neuronas del vRPO.

La proyección no-GABAérgica que hemos descrito en este trabajo desde el núcleo preóptico mediano al vRPO es bastante consistente. Experimentos realizados en rata indican que un aumento de la presión de sueño REM activa de manera muy significativa a las neuronas no-GABAérgicas del núcleo preóptico mediano (Gvila et al 2006). Estos resultados están de acuerdo con nuestros datos y sugieren que las neuronas CTb-positivas (GAD-negativas) del núcleo preóptico mediano, que son posiblemente glutamatérgicas, producen un efecto excitador directo sobre las neuronas del vRPO inductoras de sueño paradójico. Un efecto semejante es el que podrían ejercer las poco numerosas neuronas GAD-negativas que hemos encontrado en el área preóptica ventral lateral y que proyectan al vRPO; estas neuronas podrían corresponder a las pocas neuronas GAD-negativas del área preóptica ventral lateral de la rata, que se activan por la presión de sueño REM (Gvila et al 2006, Lu et al 2002). De acuerdo con nuestros datos es mas probable que estas estructuras de la región preóptica modulen directamente el sueño paradójico en lugar de hacerlo a través de una inhibición indirecta de las neuronas aminérgicas del tegmento mesopontino, como ha sido propuesto por Gvila et al (2006); de todas maneras, la inhibición de este sistema aminérgico a través de las neuronas GAD-positivas del núcleo preóptico mediano y del área preóptica ventral lateral (Gvila et al 2006), puede ser un requisito complementario para la generación de sueño paradójico.

Por último, hemos descrito también una importante conexión al vRPO desde el área preóptica medial. La lesión de este área en ratas produce una disminución de la frecuencia de los episodios de sueño REM (Srividya et al 2006); la conexión que nosotros describimos puede ser el sustrato anatómico a través del cual el área preóptica medial contribuiría al mantenimiento de la frecuencia de los episodios de sueño REM.

Es interesante señalar que todas o gran parte de las conexiones prosencefálicas que hemos descrito pueden ser el sustrato anatómico necesario para la homeostasis del sueño paradójico (De Andrés et al 2003).

### ***5.3.2 La proyección no-GABAérgica desde estructuras diencefálicas***

El vRPO recibe conexiones aferentes no-GABAérgicas muy importantes desde zona incerta, área hipotalámica dorsal, área hipotalámica lateral, núcleo hipotalámico dorsomedial, núcleo hipotalámico ventromedial, núcleo hipotalámico periventricular y área perifornical; este patrón de conexiones, preferentemente ipsilateral pero también bilateral, confirma resultados previos sobre las aferentes diencefálicas al vRPO en gato y en rata (Reinoso-Suárez et al 1990, 1994, Núñez et al 2006).

Los núcleos y áreas hipotalámicas, además de neuronas GABAérgicas, contienen neuronas que sintetizan otros neurotransmisores u otras sustancias químicas: histamina, galanina, glutamato, hormona concentradora de melanina, orexina, etc., tanto en rata como en gato (Mugnaini and Oertel 1985, Airaksinen et al 1992, Lin 2000, Elias et al 1998, Sutcliffe and de Lecea 2002). Probablemente, muchas de las proyecciones que se originan en estas neuronas establecen sinapsis asimétricas con las neuronas del vRPO (De la Roza et al 2004), y algunas deben tener su origen en neuronas hipotalámicas que están activas durante el sueño REM (Koyama et al 2003): por ejemplo, la distribución de las neuronas hipotalámicas que expresan *fos* durante el rebote de sueño REM consecuente a la privación de esta fase del sueño en la rata, es similar a la distribución de neuronas CTb-positivas en el hipotálamo y zona incerta del gato, que describimos en nuestro trabajo (Verret et al 2003); las terminales de estas neuronas diencefálicas podrían excitar a las neuronas del vRPO que generan sueño paradójico. Por otra parte, De la Roza et al (2004) han demostrado que un gran número de terminales hipotalámicas no-GABAérgicas establecen sinapsis simétricas con las neuronas del vRPO; estas terminales pueden tener su origen en neuronas hipotalámicas que tienen su máxima actividad durante la vigilia o durante el sueño no-REM (Koyama et al

2003), y utilizan otro de los muchos neurotransmisores hipotalámicos distintos del GABA durante esos otros estados del CVS.

Se ha podido demostrar que algunas de las neuronas no-GABAérgicas del hipotálamo que proyectan al vRPO pueden ser de naturaleza orexinérgicas; en trabajos realizados en nuestro laboratorio en los últimos años hemos descrito que desde la región perifornical y otras áreas hipotalámicas hay proyecciones orexinérgicas al vRPO, tanto en la rata (Núñez et al 2006) como en el gato (Rodrigo-Angulo, comunicación personal). La inyección iontoforética de orexina en el núcleo pontino oral (la región equivalente al vRPO) de la rata produce una inhibición de sus neuronas, pero este efecto se bloquea si se inyecta previamente bicuculina; esto indica que el efecto inhibitorio de la orexina puede ser debido a la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>; estos datos han permitido establecer la hipótesis de que la activación de las neuronas del vRPO puede estar mediada directamente por células orexinérgicas de hipotálamo a través de la activación indirecta de las pequeñas células gabaérgicas locales (Moreno-Balandrán et al 2008, Brischoux et al 2008).

#### **5.4 La interacción específica entre el GABA y la acetil-colina sobre el vRPO en la generación de sueño paradójico**

La acetilcolina ha sido considerada clásicamente como el principal neurotransmisor implicado en la generación de sueño REM provocada en el tegmento pontino (Baghdoyan et al 1984, Reinoso-Suárez et al 2001, Pace-Schott and Hobson 2002). Sin embargo, otros neurotransmisores o factores, como el glutamato o la sustancia P, son también efectivos para inducir sueño REM cuando se administran localmente en el tegmento pontino (Bier and McCarley 1994, Garzón et al 1996, Kohlmeier et al 2002). Los experimentos llevados a cabo en la rata y el gato han mostrado que inyecciones en el tegmento pontino de GABA y agonistas de receptores GABA<sub>A</sub> producen vigilia y suprimen el sueño activo, mientras que las microinyecciones de antagonistas del GABA producen sueño activo (Xi et al 1999a, 1999b 2004, Manquillo 2000, Sanford et al 2003).

Hemos descrito mas arriba que el vRPO recibe conexiones de estructuras troncoencefálicas y prosencefálicas relacionadas con otras fases del CVS (Reinoso-Suárez et al 1994) y hemos descrito en el presente trabajo una proyección no gabaérgica muy importante desde estructuras hipotalámicas. Estas estructuras utilizan en sus conexiones una gran variedad de neurotransmisores tanto excitadores como



inhibidores que podrían actuar de manera equilibrada sobre la actividad de las neuronas del vRPO y estar implicadas en la alternancia de las distintas fases del CVS.

En los últimos años, se están llevando a cabo una serie de estudios encaminados a demostrar la interacción entre los sistemas gabaérgicos y colinérgicos que regulan el sueño REM en el tegmento pontino. Los experimentos llevados a cabo con el gato libre sin anestesiarse, han demostrado que la inyección, previa o subsiguiente, de muscimol, un agonista de los receptores GABA<sub>A</sub>, en el núcleo reticular oral del puente, bloquea el efecto de inyección de carbacol, que normalmente da lugar a la aparición de sueño paradójico con corta latencia (Xi et al 2004). Sin embargo, la inyección de escopolamina, un antagonista de los receptores muscarínicos, no bloquea la inducción de sueño paradójico producida por la bicuculina, un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub> (Xi et al 2004). Estos datos indican que la acetil-colina no está implicada en el efecto de la bicuculina y que el efecto colinérgico excitador sobre las neuronas del vRPO, en cuanto a su participación en la generación de sueño paradójico, está controlado por un sistema GABAérgico pontino que ejerce su efecto inhibiendo a las neuronas del vRPO, con el resultado de la supresión de sueño paradójico y la aparición del estado de vigilia; cuando deja de actuar este mecanismo de control GABAérgico, aparece el sueño paradójico. Este control inhibitorio GABAérgico se ejerce directamente de forma postsináptica sobre las neuronas del vRPO generadoras de sueño paradójico (Xi et al 2004). Ya que las terminales colinérgicas sobre el vRPO son muy escasas (Rodrigo-Angulo et al 2005) y en cambio las GABAérgicas son muy abundantes, es comprensible pensar que las terminales colinérgicas puedan ejercer su acción en conjunción con otras terminales que utilicen otro neurotransmisor excitador, como puede ser el glutamato (Boissard et al 2002), ya que es frecuente encontrar terminales GABAérgicas junto con terminales asimétricas en el vRPO (De la Roza and Reinoso-Suárez 2006). Para otros autores, el efecto que ejerce el GABA sobre la acción de la acetil-colina podría hacerse de manera presináptica (Baghdoyan et al 2002); esta aseveración podría estar justificada por esas terminales GABAérgicas que se pueden observar en contacto con las terminales asimétricas y que podrían actuar directamente sobre ellas impidiendo la liberación del correspondiente neurotransmisor (De la Roza and Reinoso-Suárez 2006. Marks et al 2008) (Figura 5.1). Tomados en conjunto, todos estos datos indican que la supresión de un impulso GABAérgico tónico sobre las neuronas pontinas generadoras de sueño paradójico, es el suceso clave para que se produzca el sueño paradójico (Luppi et al 2007).

### 5.5 Consideraciones finales

Sin embargo, si la localización de las neuronas GABAérgicas de este sistema es local en el tronco del encéfalo o está localizado en estructuras mas lejanas, estaba todavía por resolver (Xi et al 1999a, 1999b). En nuestro trabajo hemos demostrado la existencia de una gran cantidad de conexiones al vRPO desde el prosencéfalo basal, el hipotálamo, la zona incerta y el núcleo reticular del tálamo; por lo menos una parte del sistema GABAérgico que interacciona con los sistemas colinérgicos en el tegmento pontino se origina en el núcleo reticular del tálamo, el hipotálamo posterolateral y la zona incerta, ya que solo desde esas estructuras hay una proyección GABAérgica consistente al vRPO. Probablemente, estas estructuras están inhibiendo a las neuronas del vRPO que generan y mantienen el sueño paradójico. Las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular del tálamo y la zona incerta pueden estar relacionadas con la organización del sueño lento, mientras que las del hipotálamo posterolateral estaría relacionado con la organización de la vigilia. De esta manera la acción inhibitoria de las neuronas del núcleo reticular del tálamo actuaría sobre las neuronas del vRPO inhibiendo su actividad durante las fases de sueño no-REM, mientras que la actividad de las áreas hipotalámicas vigilantígenas inhibiría su actividad durante la fase de vigilia (Figura 5.1).

Las abundantes conexiones no-GABAérgicas desde prosencéfalo basal y diencefalo podrían excitar a las neuronas del vRPO a través de sinapsis asimétricas, modulando tanto la generación de sueño paradójico como la homeostasis. Sin embargo, muchas de estas conexiones no-GABAérgicas podrían estar inhibiendo a las neuronas del vRPO durante los otros estados del CVS; esta inhibición se podría ejercer tanto directamente por medio de las terminales no-GABAérgicas que forman sinapsis simétricas (De la Roza et al 2004), o bien indirectamente a través de la activación de neuronas serotoninérgicas locales (Rodrigo-Angulo et al 2000) y/o de las propias neuronas GABAérgicas del vRPO (Figura 5.1). Este mecanismo podría ser similar al propuesto para las neuronas hipocretinérgicas del hipotálamo posterolateral en la rata (Núñez et al 2006).

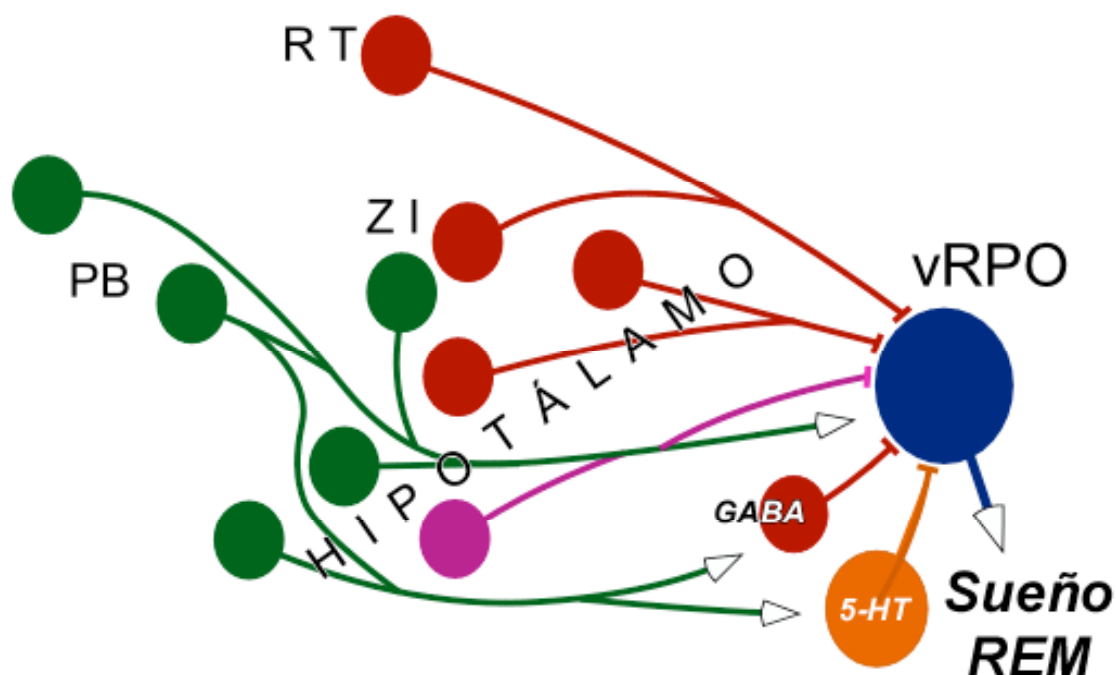


Figura 5.1.- Esquema resumen de las conexiones aferentes desde prosencéfalo basal y estructuras diencefálicas y troncoencefálicas al vRPO. Los círculos rojos representan neuronas GABAérgicas, los círculos verdes y fucsia representan neuronas no-GABAérgicas, y el círculo marrón representa neuronas serotoninérgicas. Las barras y puntas de flecha representan, respectivamente, sinapsis inhibitorias y sinapsis excitatorias.

Las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular del tálamo y de la zona incerta podrían inhibir a las neuronas inductoras de sueño REM del vRPO durante el sueño lento, mientras que las neuronas GABAérgicas del hipotálamo estarían activas durante la vigilia, inhibiendo el sueño REM.

Un gran número de neuronas no-GABAérgicas del prosencéfalo basal y de estructuras hipotalámicas estarían ejerciendo un efecto excitador directo sobre la organización del sueño REM a través de las sinapsis excitadoras que realizan sobre las neuronas del vRPO. Por otra parte, las neuronas no-GABAérgicas del prosencéfalo basal, hipotálamo y zona incerta podrían inhibir a las neuronas del vRPO, tanto directamente por medio de sinapsis inhibitorias (representada en color fucsia), o por medio de una excitación indirecta a través de neuronas GABAérgicas o serotoninérgicas locales.

PB: Prosencéfalo basal, RT: núcleo reticular del tálamo, ZI: zona incerta

## *6. CONCLUSIONES*

## **6. CONCLUSIONES**

El análisis de los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre las conexiones GABAérgicas y no-GABAérgicas al vRPO, la región pontina generadora de sueño paradójico en el gato, nos ha permitido enunciar las siguientes conclusiones:

**Primera.-** Nuestros resultados demuestran la existencia de conexiones GABAérgicas y/o no-GABAérgicas al vRPO desde el prosencéfalo basal, el núcleo reticular del tálamo, en menor grado de otras estructuras talámicas, el hipotálamo, la zona incerta y el tronco del encéfalo. Esto demuestra la existencia de neuronas GABAérgicas de axón largo que inervan neuronas pontinas responsables la generación de sueño REM.

**Segunda.-** Las proyecciones GABAérgicas al vRPO no son abundantes si nos referimos al total sus conexiones aferentes. Proceden principalmente del núcleo reticular del tálamo y, en menor proporción, del núcleo hipotalámico dorsocaudal, de la zona incerta y de las áreas hipotalámicas dorsal y lateral. También hay una pequeña proporción de proyecciones que proceden del tegmento mesopontino, del vRPO contralateral, del locus coeruleus y del tegmento bulbar.

**Tercera.-** Las proyecciones no-GABAérgicas al vRPO son mas abundantes que las GABAérgicas y proceden del prosencéfalo basal, de los núcleos de la habénula, de la zona incerta, de las áreas hipotalámicas dorsal y lateral, del hipotálmo posterolateral y de la región perifornical, así como de numerosas estructuras troncoencefálicas tales como el colículo superior, la sustancia gris periacueductal, la formación reticular mesencefálica, los núcleos del tegmento laterodorsal y pedunculopontino, el locus coeruleus, el vRPO contralateral y la formación reticular bulbar.

**Cuarta.-** La proyección GABAérgica mas importante que recibe el vRPO procede del núcleo reticular del tálamo; esta proyección es exclusivamente ipsilateral y se origina en los sectores rostrales y caudales infrageniculados de dicho núcleo talámico. La función de esta proyección GABAérgica sería la de inhibir la actividad de las neuronas del vRPO durante las fases de sueño no-REM.

**Quinta.-** Las conexiones aferentes que recibe el vRPO desde la zona incerta tienen un importante componente de fibras no-GABAérgicas, el 84,7%, frente al componente de fibras aferentes GABAérgicas, que son el 15,3% restante. La proyección GABAérgicas desde la zona incerta podría ejercer un mecanismo, semejante al que ejercen las neuronas del núcleo reticular del tálamo, para inhibir a las neuronas del vRPO durante el sueño no-REM.

**Sexta.-** El vRPO recibe conexiones aferentes desde estructuras hipotalámicas, principalmente desde las áreas hipotalámicas dorsal y lateral, de las que un 15% son GABAérgicas y un 85% no-GABAérgicas. La conexión GABAérgica desde estas áreas hipotalámicas puede ejercer la función de inhibir a las neuronas del vRPO durante la fase de vigilia.

**Séptima.-** Describimos por primera vez la naturaleza bioquímica GABAérgica de las neuronas del núcleo hipotalámico dorsocaudal, origen de una importante proyección al vRPO y cuya función, todavía por dilucidar, podría ser la de contribuir a suprimir la inducción de sueño REM durante la vigilia.

**Octava.-** Las abundantes conexiones no-GABAérgicas que recibe el vRPO desde prosencéfalo basal y diencefalo, podrían modular tanto la generación de sueño REM como la homeostasis durante los otros estados del CVS, bien directamente por medio de terminales excitatorias y/o inhibitorias no-GABAérgicas, bien indirectamente a través de la activación de neuronas GABAérgicas locales del vRPO.

**Novena.-** Aunque el número de neuronas GABAérgicas del tronco del encéfalo que proyectan al vRPO es pequeño, el papel de estas neuronas sería esencial para modular, mediante sinapsis inhibitorias, la acción de las proyecciones no-GABAérgicas desde la zona incerta y el hipotálamo, durante las distintas fases del CVS.

## *7. BIBLIOGRAFÍA*

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamson EE, Moore RY (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916:172-91.
- Airaksinen MS, Alanen S, Szabat E, Visser TJ, Panula P (1992) Multiple neurotransmitters in the tuberomammillary nucleus: comparison of rat, mouse and guinea pig. *J Comp Neurol* 323: 103-116.
- Arcelli P, Frassoni C, Regondi MC, De Biasi S, Spreafico R (1997) GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity?. *Brain Res Bull* 42: 27-37.
- Aserinski E, Kleitmann N (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118: 273-274.
- Avendaño C, Reinoso-Suárez F (1975) Atlas estereotáxico de la amígdala, el hipotálamo y la región preóptica en el gato. Ediciones del Servicio de Publicaciones. Universidad Autónoma de Madrid.
- Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo ML, McCarley RW, Hobson JA (1984a) Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res* 306: 39-52.
- Baghdoyan HA, Monaco AP, Rodrigo-Angulo ML, Assens F, McCarley RW, Hobson JA (1984b) Microinjection of neostigmine into the pontine reticular formation of cats enhances desynchronized sleep signs. *J Pharmacol Exp Therapeut* 231: 173-180.
- Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo ML, McCarley RW, Hobson JA (1987) A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res* 414: 245-61.
- Baghdoyan HA, Spotts JL, Snyder SG (1993) Simultaneous pontine and basal forebrain microinjections of carbachol suppress REM sleep. *J Neurosci* 13: 229-242.
- Baghdoyan HA, Vasquez J, Wilcox M, Wiesenauer K (2002) Pontine acetylcholine (Ach) release is modulated by GABA<sub>A</sub> receptors. *Soc Neurosci Abstr* 28: 870.3.
- Batini C, Moruzzi G, Palestini M, Rossi GF, Zanchetti A (1958) Persistent patterns of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation. *Science* 128: 30-32.
- Batini C, Moruzzi G, Palestini M, Rossi GF, Zanchetti A (1959a) Effects of complete pontine transections on the sleep-wakefulness rhythm: the midpontine pretrigeminal preparation. *Arch Ital Biol* 96: 1-12.
- Batini C, Magni F, Palestini M, Rossi GF, Zanchetti A (1959b) Neural mechanisms underlying the enduring EEG and behavioral activation in the midpontine pretrigeminal cat. *Arch Ital Biol* 97: 13-25.
- Berger H (1930) Ueber das Elektroenkephalogramm des Menschen. *J Psychol Neurol* 40: 160-179.
- Berman AL (1968) The brain stem of the cat. University of Wisconsin Press, Madison.
- Berry DJ, Ohara PT, Jeffery G, Lieberman AR (1986) Are there connections between the thalamic reticular nucleus and the brainstem reticular formation?. *J Comp Neurol* 243: 347-362.
- Bier MJ, McCarley RW (1994) REM-enhancing effects of the adrenergic antagonist idazoxan infused into the medial pontine reticular formation of the freely moving cat. *Brain Res* 634: 333-338.



- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319: 218-245.
- Bleier R, Bard P, Woods JW (1966) Cytoarchitectonic appearance of the isolated hypothalamus of the cat. *J Comp Neurol* 128: 255-312.
- Boissard R, Gervasoni D, Fort P, Henninot V, Barbagli B, Luppi P-H (2000) Neuronal networks responsible for paradoxical sleep onset and maintenance in rats: a new hypothesis. *Sleep* 23 suppl: 107.
- Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi P-H (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 16: 1959-1973.
- Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B, Luppi P-H (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci* 18: 1627-1639.
- Bonvallet M, Dell P, Hiebel G (1954) Tonus sympathique et activité électrique corticale. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 6: 119-144.
- Borbély AA, Achermann P (2000) Sleep homeostasis and models of sleep regulation. In: MH Kryger, T Roth, WC Dement (eds.) *Principles and practice of sleep medicine*. Raven Press, New York. pp. 377-390.
- Bowery N (1989) GABA<sub>B</sub> receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol* 101: 401-407.
- Brashear HR, Zaborski L, Heimer L (1986) Distribution of GABAergic and cholinergic neurons in the rat diagonal band. *Neuroscience* 17: 439-451.
- Bremer F (1935) Cerveau isolé et physiologie du sommeil. *Comptes Rendues Séances Societé Biologie* 118: 1235-1241.
- Brischoux F, Mainville L, Jones BE (2008). Muscarinic-2 and orexin-2 receptors on GABAergic and other neurons in the rat mesopontine tegmentum and their potential role in sleep-wake state control. *J Comp Neurol* 510: 607-630.
- Caballero A, De Andrés I (1986) Unilateral lesions in locus coeruleus area enhance paradoxical sleep. *EEG Journal* 64: 339-346.
- Camacho-Evangelista A, Reinoso-Suárez F (1964) Activating and synchronizing centres in cat brain. *Electroencephalograms after lesions*. *Science* 146: 268-269.
- Cordeau JP, Mancina M (1959) Evidence for the existence of an electroencephalographic synchronization mechanism originating in the lower brain stem. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 11: 551-564.
- Cordeau JP, Moreau A, Beaulnes A, Laurin C (1963) EEG and behavioral changes following microinjections of acetylcholine in the brainstem of cats. *Arch Ital Biol* 101: 30-47.
- Crunelli V, Leresche N (1991) A role for GABA<sub>B</sub> receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *Trends Neurosci* 14: 16-21.

- Davis H, Davis PA, Loomis AL (1937) Changes in human brain potentials during the onset of sleep. *Science* 86: 448-450.
- Davis H, Davis PA, Loomis AL (1938) Human brain potentials during the onset of sleep. *J Neurophysiol* 1: 24-38.
- Dement W (1958) The occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep and their relation to eye movements, body mobility and dreaming. *Electroencephalograph Clin Neurophysiol* 10: 291-296.
- Deschênes M, Madariaga-Domich A, Steriade M (1985) Dendrodendritic synapses in the cat reticularis thalamic nucleus: a structural basis for thalamic spindle synchronization. *Brain Res* 334: 165-168.
- Detari L, Juhasz G, Kukorelli T (1984) Firing properties of cat basal forebrain neurons during sleep-wakefulness cycle. *Electroencephalograph Clin Neurophysiol* 58: 362-368.
- De Andrés I, Garzón M, Villablanca JR (2003). The disconnected brain stem does not support rapid eye movement sleep. Rebound following selective deprivation. *Sleep* 26: 419-425.
- De Andrés I, Gómez-Montoya J, Gutiérrez-Rivas E, Reinoso-Suárez F (1985) Differential action upon sleep status of ventrolateral and central areas of pontine tegmental field. *Arch Ital Biol* 123: 1-11.
- De la Roza C, Reinoso-Suárez F (2000) Ultrastructural synaptic organization of axon terminals in the ventral part of the oral pontine reticular nucleus. *J Comp Neurol* 427: 31-53.
- De la Roza C, Reinoso-Suárez F (2003) GABAergic input from the posterior lateral hypothalamus to the ventral part of the oral pontine reticular nucleus in the cat. *Soc Neurosci Abstr* 888: 17.
- De la Roza C, Reinoso-Suárez F (2006) Gabaergic structures in the ventral part of the oral pontine reticular nucleus: an ultrastructural immunogold analysis. *Neuroscience* 142: 1183-1193.
- De la Roza C, Martínez-Mena J, Sánchez-Valle ME, Reinoso-Suárez F (2004) Projections from the cat posterior lateral hypothalamus to the ventral part of the oral pontine reticular nucleus contain a GABA component. *Brain Res* 1020: 118-129.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 322-327.
- Drucker-Colin R, Pedraza JGB (1983) Kainic acid lesions of gigantocellular tegmental field (FTG) neurons does not abolish REM sleep. *Brain Res* 272: 387-391.
- Edwards SB, Ginsburgh CL, Henkel CK, Stein BE (1979) Sources of subcortical projections to the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 184: 309-330.
- Eisensehr I, Noachtar S, von Schlippenbach C, Uttner I, Kleine J, Seelos K, Helmchen C (2003) Hypersomnia associated with bilateral posterior hypothalamic lesion. *Eur Neurol* 49: 169-172.
- Elias CF, Saper CB, Marartos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollman MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402: 442-459.
- Fenik VB, Kubin, L (2008) Differential localization of carbachol- and bicuculline-sensitive pontine sites for eliciting REM sleep-like effects in anesthetized rats. *J Sleep Res* 18: 99-112.

- Fisher RS, Buchwald NA, Hull CD, Levine MS (1988) GABAergic basal forebrain neurons project to the neocortex: the localization of glutamic acid decarboxylase and choline acetyltransferase in feline corticopetal neurons. *J Comp Neurol* 272: 489-502.
- Ford B, Holmes CJ, Mainville L, Jones BE (1995) GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J Comp Neurol* 363: 177-196.
- Fort P, Khateb A, Serafin M, Mühlethaler M, Jones BE (1998) Pharmacological characterization and differentiation of non-cholinergic nucleus basalis neurons in vitro. *Neuroreport* 9: 61-65.
- Franken P, Kopp C, Landolt H-P, Lüthi A (2009) The functions of sleep. *Eur J Neurosci* 29: 1739-1740.
- Franken P, Dijk D-J (2009) Circadian clock genes and sleep homeostasis. *Eur J Neurosci* 29: 1820-1829.
- Gallopín T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, Audinat E, Mühlethaler M, Serafin M (2000) Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature* 404: 992-995.
- Garzón M, de Andrés I, Reinoso-Suárez F (1996) Sleep patterning after cholinergic and glutamatergic stimulation in the ventral oral pontine tegmentum. *J Sleep Res* 5 Suppl 1: 72.
- Garzón M, de Andrés I, Reinoso-Suárez F (1998) Sleep patterns after carbachol delivery in the ventral oral pontine tegmentum of the cat. *Neuroscience* 83: 1137-1144.
- Gritti I, Mainville L, Jones BE (1993) Codistribution of GABA- with acetylcholine-synthesizing neurons in the basal forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 329: 438-547.
- Gritti I, Mainville L, Jones BE (1994) Projections of GABAergic and cholinergic basal forebrain and GABAergic preoptic-anterior hypothalamic neurons to the posterior lateral hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 339: 251-268.
- Gritti I, Mainville L, Mancía M, Jones BE (1997) GABAergic and other non-cholinergic basal forebrain neurons project together with cholinergic neurons to meso- and iso-cortex in the rat. *J Comp Neurol* 383: 163-177.
- Gritti I, Mariotti M, Mancía M (1998) GABAergic and cholinergic basal forebrain and preoptic-anterior hypothalamic projections to the mediodorsal nucleus of the thalamus in the cat. *Neuroscience* 85: 149-178.
- Gritti I, Manns ID, Mainville L, Jones BE (2003) Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat. *J Comp Neurol* 458: 11-31.
- Gritti I, Henny P, Galloni F, Mainville L, Mariotti M, Jones BE (2006) Stereologic estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphatase-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters. *Neuroscience* 143: 1051-1064.
- Grofovà I, Ottersen OP, Rinvik E (1978) Mesencephalic and diencephalic afferents to the superior colliculus and periaqueductal gray substance demonstrated by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in the cat. *Brain Res* 146: 205-220.
- Gutiérrez-Rivas E, De Andrés I, Gómez-Montoya J, Reinoso-Suárez F (1978) The influence of rostromedial ventrolateral region on the sleep-wakefulness cycle. *Experientia* 34: 61-62.

- Gutiérrez-Rivas E, De Andrés I (1980) The sleep-wakefulness cycle. II: Modifications after rostromedial lesions. *Arch Neurobiol* 43: 353-376.
- Gvilia I, Turner A, McGinty D, Szymusiak R (2006) Preoptic area neurons and the homeostatic regulation of rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 26: 3037-3044.
- Harvey EN, Loomis AL, Hobart GA (1937) Cerebral states during sleep as studied by human brain potentials. *Science* 85: 443-444.
- Hayes RL, Pechura CM, Katayama Y, Povlishock JT, Giebel ML, Becker DP (1984) Activation of pontine cholinergic sites implicated in unconsciousness following cerebral concussion in the cat. *Science* 223: 301-303.
- Hendricks JC, Morrison AR, Mann GL (1982) Different behaviors during paradoxical sleep without atonia depend on pontine lesion site. *Brain Res* 239: 81-105.
- Henley K, Morrison AR (1974) A re-evaluation of the effects of lesions of the pontine tegmentum and locus coeruleus on phenomena of paradoxical sleep in the cat. *Acta Neurobiol Exp* 34: 215-232.
- Henny P, Jones BE (2003) Vesicular transporter proteins for glutamate (VgluT), GABA (VGAT) and acetylcholine (VACHT) in terminal varicosities of basal forebrain neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *Sleep* 26: A9.
- Hernández-Peón R (1965) A cholinergic hypnogenic limbic forebrain-hindbrain circuit. In: *Neurophysiologie des états du sommeil*. Jouvet M (ed) CNRS. Paris.
- Hess WR (1931) Le sommeil. *Comptes Rendues Séances Société Biologie* 107: 1333-1360.
- Hobson JA, McCarley RW, Pivik T, Freedman R (1974) Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. *J Neurophysiol* 37: 497-511.
- Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189: 55-58.
- Hobson JA, Pace-Schott EF (2002) The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nat Rev Neurosci* 3: 679-693.
- Hofle N, Paus T, Reutens D, Fiset P, Gotman J, Evans AC, Jones BE (1997) Regional cerebral blood flow changes as a function of delta and spindle activity during slow wave sleep in humans. *J Neurosci* 17: 4800-4808.
- Horner RL, Kubin L (1999) Pontine carbachol elicits multiple rapid eye movement sleep-like neural events in urethane-anaesthetized rats. *Neuroscience* 93: 215-226.
- Hsu S-M, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580.
- Iwakiri H, Matsuyama K, Mori S (1993) Extracellular levels of serotonin in the medial pontine reticular formation in relation to sleep-wake cycle in cats: a microdialysis study. *Neurosci Res* 18: 157-170.
- Jacobs BL, Jones BE (1978) The role of the central monoamine and acetylcholine systems in sleep-wakefulness states: mediation or modulation?. In: *Cholinergic-monoaminergic interactions in the brain*. Butcher LL (ed). Academic Press, New York. pp 271-290.

- Jasper H, Ajmone-Marsan CA (1954) A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat. Ottawa, Ontario, Canada: The National Research Council of Canada.
- Jones BE (1979) Elimination of paradoxical sleep by lesions of the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Neurosci Lett* 13: 285-293
- Jones BE (1991) Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 40: 637-656.
- Jones BE (1993) The organization of central cholinergic systems and their functional importance in sleep-waking states. In: Cuello AC (ed). *Cholinergic Function and dysfunction. Progress in Brain Research* 98. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 61-71.
- Jones BE (1995) Reticular formation: cytoarchitecture, transmitters and projections. In: *The rat nervous system*. Paxinos G (ed). Academic Press Australia, New South Wales, Australia. pp155-171.
- Jones BE (2000) Basic mechanisms of sleep-wake states. In: *Principles and practice of sleep medicine*. Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Elsevier Saunders, Philadelphia. pp 134-154.
- Jones BE (2005a) Basic mechanisms of sleep-wake states. In: *Principles and practice of sleep medicine*. Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Elsevier Saunders, Philadelphia. pp 136-153.
- Jones BE (2005b) From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sciences* 26: 578-586.
- Jones BE, Harper ST, Halaris AE (1977) Effects of locus coeruleus lesions upon cerebral monoamine content, sleep-wakefulness states and the response to amphetamine. *Brain Res* 124: 473-496.
- Jones BE, Yang T-Z (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol* 242: 56-92.
- Jones BE, Cuello AC (1989) Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic-catecholamine, serotonin, and acetylcholine-neurons. *Neuroscience* 31:37-61.
- Jones EG (1975) Some aspects of the organization of the thalamic reticular complex. *J Comp Neurol* 162: 285-308.
- Jongen-Rêlo AL, Amaral DG (1998). Evidence for a GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the brainstem of the macaque monkey: a combined retrograde tracing and *in situ* hybridization study. *European Journal of Neuroscience* 10: 2924-2933.
- Jouvet M, Michel F, Courjon J (1959) Sur un stade d'activité électrique cérébrale rapide au cours du sommeil physiologique. *Comptes Rendues Séances Société Biologie* 153: 1024-1028.
- Jouvet M (1962) Recherches sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique. *Arch Ital Biol* 100: 125-206.
- Jouvet M (1972) The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergebn Physiol* 64: 165-307.
- Jouvet M, Delorme F (1965) Locus coeruleus et sommeil paradoxal. *Comptes Rendues Séances Société Biologie* 159: 895-899.

- Kasamatsu T (1969) Spontaneous unitary discharges of the mesencephalic reticular formation during sleep and wakefulness in normal and chronically blinded cats. *Brain Res* 14: 506-509.
- Kievit J, Kuypers HGJM (1975) Basal forebrain and hypothalamic connections to frontal and parietal cortex in the rhesus monkey. *Science* 187: 660-662.
- Kilduff TS, Lein ES, de la Iglesia H, Sakurai T, Fu Y-H, Shaw P (2008) New developments in sleep research: molecular genetics, gene expression, and systems neurobiology. *J Neurosci* 28: 11814-11818.
- Kleitman N (1963) Sleep and wakefulness. University Chicago Press, Chicago.
- Kobayashi Y, Matsuyama K, Mori S (1994) Distribution of serotonin cells projecting to the pontomedullary reticular formation in the cat. *Neurosci Res* 20: 43-55.
- Kohlmeier KA, Burns J, Reiner PB, Semba K (2002) Substance P in the descending cholinergic projection to REM sleep-induction regions of the rat pontine reticular formation: Anatomical and electrophysiological analysis. *Eur J Neurosci* 15: 176-196.
- Kohyama J, Lai YY, Siegel JM (1998) Conduction velocity of the reticulospinal system mediating muscle tone suppression. *J Neurophysiol* 80: 1839-1851.
- Kosaka TK, Kosaka K, Hataguchi Y, Nagatsu I, Wu J-Y, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Hama K (1987) Catecholaminergic neurons containing GABA-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp Brain Res* 70: 605-617.
- Koyama Y, Hayaishi O (1994) Firing of neurons in the preoptic/anterior hypothalamic areas in rats: its possible involvement in slow wave sleep and paradoxical sleep. *Neurosci Res* 19: 31-38.
- Koyama Y, Takahashi K, Kodama T, Kayama Y (2003) State-dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. *Neuroscience* 119: 1209-1219.
- Kshatri AM, Baghdoyan HA, Lydic R (1998) Cholinomimetics, but not morphine, increase antinociceptive behavior from pontine reticular regions regulating rapid-eye-movement sleep. *Sleep* 21: 677-685.
- Kuriyama K, Mishima K, Suzuki H, Aritake S, Uchiyama M (2008) Sleep accelerates improvement in working memory performance. *J Neurosci* 28: 10145-10150.
- Lai YY, Siegel JM (1988) Medullary regions mediating atonia. *J Neurosci* 8: 4790-4796.
- Laurent JP, Cespuglio R, Jouvet M (1974) Délimitation des voies ascendantes de l'activité pontogéniculo-occipitale chez le chat. *Brain Res* 65: 29-52.
- Leonard TO, Lydic R (1997) Pontine nitric oxide modulates acetylcholine release, rapid eye movement sleep generation, and respiratory rate. *J Neurosci* 17: 774-785.
- Lin J-S, Sakai K, Vanni-Mercier G, Jouvet M (1989) A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Res* 479: 225-240.
- Lin J-S (2000) Brain structures and mechanisms involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. *Sleep Med Rev* 4: 471-503.
- Lindsley DB, Schreiner LH, Knowles WB, Magoun HW (1950) Behavioral and EEG changes following chronic brain stem lesions in the cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 2: 483-498.

- Lu J, Bjorkum AA, Xu M, Gaus SE, Shiromani PJ, Saper CB (2002) Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 22: 4568-4576.
- Luebke JJ, Greene RW, Semba K, Kamondi A, McCarley RW, Reiner PB (1992) Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 743-747.
- Lugaresi E, Montagna P, Cortelli P, Gambetti PL (1990) Fatal familial insomnia: role of the thalamus in endocrine and autonomic regulation. In: Mancina M, Marini G (eds). *The Diencephalon and Sleep*. Raven Press, New York. pp 293-299.
- Luppi P-H, Gervasoni D, Verret L, Goutagny R, Peyron C, Salvert D, Leger L, Fort P (2007) Paradoxical (REM) sleep genesis: The switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J Physiol* 100:271-283.
- Llewellyn-Smith IJ, Minson JB, Wright AP, Hodgson AJ (1990) Cholera toxin B-gold, a retrograde tracer that can be used in light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 294: 179-191.
- Magnes J, Moruzzi G, Pompeiano O (1961) Synchronization of the EEG produced by low-frequency electrical stimulation of the region of the solitary tract. *Arch Ital Biol* 99: 33-67.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (1999) Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 19: 3057-3072.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 20: 4669-4679.
- Manohar S, Noda H, Ross Adey W (1972) Behavior of mesencephalic reticular neurons in sleep and wakefulness. *Exp Neurol* 34: 140-157.
- Manns ID, Alonso A, Jones BE (2000) Discharge profiles of juxtacellularly labeled and immunohistochemically identified GABAergic basal forebrain neurons recorded in association with electroencephalogram in anesthetized rats. *J Neurosci* 20: 9252-9263.
- Manns ID, Mainville L, Jones BE (2001) Evidence for glutamate, in addition to acetylcholine and GABA, neurotransmitter synthesis in basal forebrain neurons projecting to the entorhinal cortex. *Neuroscience* 107: 249-63.
- Manns ID, Lee MG, Modirrousta M, Hou YP, Jones BE (2003) Alpha 2 adrenergic receptors on GABAergic, putative sleep-promoting basal forebrain neurons. *Eur J Neurosci* 18: 723-727.
- Manquillo A, De Andrés I, Garzón M, Reinoso-Suárez F (1999) Determining the rostral limit of the pontine tegmentum area that generates paradoxical sleep in response to cholinergic stimulation. *J Physiol Biochem* 53: 206.
- Manquillo A (2000) Estudio de los mecanismos colinérgicos y gabaérgicos mediados por el tegmento pontino rostral en las fases del ciclo vigilia-sueño. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Marini G, Imeri L, Mancina M (1988) Changes in sleep-waking cycle induced by lesion of medialis dorsalis thalamic nuclei in the cat. *Neurosci Lett* 85: 223-227.

- Marini G, Gritti I, Mancina M (1989) Changes in EEG spindle activity induced by ibotenic acid lesions of medialis dorsalis thalamic nuclei in the cat. *Brain Res* 500: 395-399.
- Marini G, Mancina M (1990) *The Diencephalon and Sleep*. Raven Press, New York.
- Marini G, Gritti I, Mancina M (1990) The role of some thalamic nuclei in sleep mechanisms: evidence from chemical lesions in the cat. In: Mancina M, Marini G (eds). *The Diencephalon and Sleep*. Raven Press, New York. pp 279-292.
- Marks GA, Sachs OW, Birabil CG (2008). Blockade of GABA, type A, receptors in the rat pontine reticular formation induces rapid eye movement sleep that is dependent upon the cholinergic system. *Neuroscience* 156: 1-10.
- Masri RM, Trageser JC, Bezdudaya T, Li Y, Keller A (2006) Cholinergic regulation of the posterior medial thalamic nucleus. *J Neurophysiol* 96: 2265-2273.
- McCarley RW, Hobson JA (1971) Single neuron activity in cat gigantocellular tegmental field: selectivity of discharge in desynchronized sleep. *Science* 174: 1250-1252.
- McCarley RW, Nelson JP, Hobson JA (1978) Ponto-geniculo-occipital (PGO) burst neurons: correlative evidence for neuronal generators of PGO waves. *Science* 201: 269-272.
- McGinty DJ, Sterman MB (1968) Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat. *Science* 160: 1253-1255.
- McGinty DJ, Harper RM, Fairbanks MK (1974) Neuronal unit activity and the control of sleep states. In: *Advances in sleep research*. Weitzman ED (ed). Spectrum Publications, New York. pp 173-216.
- McGinty D, Szymusiak R (2005) Sleep-promoting mechanisms in mammals. In: *Principles and practice of sleep medicine*. Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). Elsevier Saunders, Philadelphia. pp 169-184.
- Mendelson WB (1985) GABA-benzodiazepine receptor-chloride ionophore complex: implications for the pharmacology of sleep. In: *Sleep: neurotransmitters and neuromodulators*. Wauquier A, Monti JM, Gaillard JM (eds). Raven Press, NEW York. pp 229-234.
- Modirrousta M, Mainville L, Jones BE (2004) GABAergic neurons with alpha2-adrenergic receptors in basal forebrain and preoptic area express c-Fos during sleep. *Neuroscience* 129: 803-810.
- Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends Neurosci* 27: 569-575.
- Moreno-Balandrán E, Garzón M, Bódalo C, Reinoso-Suárez F, de Andrés I (2008). Sleep-wakefulness effects after microinjections of hypocretin 1 (orexin A) in cholinceptive areas of the cat oral pontine tegmentum. *Eur J Neurosci* 28: 331-41
- Morison RS, Dempsey EW (1942) A study of thalamo-cortical relations. *Am J Physiol* 135: 281-292.
- Moruzzi G (1960) Synchronizing influences of the brain stem and the inhibitory mechanisms underlying the production of sleep by sensory stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 13: 231-256.
- Moruzzi G (1972) The sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol* 64: 1-165.
- Moruzzi G, Magoun HW (1949) Brainstem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1: 455-473.



- Mugnaini E, Oertel WH (1985) An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals. In: Bjorklund A, Hokfelt T (eds). *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol 4: GABA and neuropeptides in the CNS, Part I.: Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 436-622.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827: 243-260.
- Nauta WJH (1946) Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. *J Neurophysiol* 9: 285-316.
- Nauta WHJ, Kuypers HGJM (1975) Some ascending pathways in the brainstem reticular formation In: *Reticular Formation of the Brain*. Jasper HH, Proctor LD, Knighton RS, Noshay WC and Costello RT (eds). Little, Brown and Co., Boston. pp 3-30.
- Nicoll RA (1978) Pentobarbital: differential postsynaptic actions on sympathetic ganglion cells. *Science* 199: 451-452.
- Nitz D, Siegel JM (1977a) GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience* 78: 795-801.
- Nitz D, Siegel JM (1977b) GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am J Physiol* 273: 451-454.
- Núñez A (1996) Unit activity of rat basal forebrain neurons: relationship to cortical activity. *Neuroscience* 72: 757-766.
- Núñez A, De la Roza C, Rodrigo-Angulo ML, Buño W, Reinoso-Suárez F (1997) Electrophysiological properties and cholinergic responses of rat ventral oral pontine reticular neurons in vitro. *Brain Res* 754: 1-11.
- Núñez A, Buño W, Reinoso-Suárez F (1998) Neurotransmitters action on oral pontine tegmental neurons of the rat: an in vitro study. *Brain Res* 804: 144-148.
- Núñez A, Rodrigo-Angulo ML, De Andrés I, Reinoso-Suárez F (2002) Firing activity and postsynaptic properties of morphologically identified neurons of ventral oral pontine reticular nucleus. *Neuroscience* 115: 1165-1175.
- Núñez A, Moreno-Balandrán ME, Rodrigo-Angulo ML, Garzón M, de Andrés I (2006) Relationship between the perifornical hypothalamic area and oral pontine reticular nucleus in the rat. Possible implication of the hypocretinergic projection in the control of rapid eye movement sleep. *Eur J Neurosci* 24: 2834-2842.
- Oertel WH, Graybiel AM, Mugnaini E, Elde RP, Schemmchel DE, Kopin IJ (1983) Coexistence of glutamic acid decarboxylase- and somatostatin-like immunoreactivity in neurons of the feline nucleus reticularis thalami. *J Neurosci* 3: 1322-1333.
- Pace-Schott EF, Hobson JA (2002) The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci* 3: 591-605.
- Papp M, Bozsik G (1966) Comparison of the cholinesterase activity in the reticular formation of the lower brain stem of cat and rabbit. *J Neurochem* 13: 697-703.
- Penaloza-Rojas JH, Elterman M, Olmos N (1964) Sleep induced by cortical stimulation. *Expl Neurol* 10: 140-147.

- Pinault D, Deschênes M (1998) Projection and innervation patterns of individual thalamic reticular axons in the thalamus of the adult rat: A three-dimensional, graphic, and morphometric analysis. *J Comp Neurol* 391: 180-203.
- Pollock MS, Mistlberger RE (2003) Rapid eye movement sleep induction by microinjection of the GABA-A antagonist bicuculline into the dorsal subcoeruleus area of the rat. *Brain Res* 962: 68-77.
- Rechtschaffen A, Kales A (1968) A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. Bethesda, MD: National Institutes for Health.
- Reinoso-Suárez F (1960) Modifications of the potential evoked by acoustic stimuli by means of diathermo-coagulation in the diencephalon. *J Comp Neurol* 114: 207-215.
- Reinoso-Suárez F (1961a) El sistema reticular ascendente de activación. Desarrollo de un escalón diencefálico en el hombre y estudio experimental en el gato. Madrid: Publicaciones del C.S.I.C.
- Reinoso-Suárez F (1961b) *Topographischer Hirnatlas der Katze*. E. Merck A.G., Darmstad.
- Reinoso-Suárez F (1963) Effects of diencephalic and mesencephalic lesions upon afferent impulses in the central sensory pathways. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, suppl 24:33-42.
- Reinoso-Suárez F (1966) Phylogenesis and ontogenesis of the forebrain. In: *Evolution of the forebrain*. Hassler R, Stephan H (eds). Georg Thieme Verlag, Stuttgart. pp 296-304.
- Reinoso-Suárez F (1997) Neurobiología del despertar y la vigilia. *An R Acad Nac Med* 114: 249-265.
- Reinoso-Suárez F (1998) Identificador del director de la orquesta neuronal responsable del sueño paradójico. *An R Acad Nac Med* 115: 239-259.
- Reinoso-Suárez F (1999) The neurobiology of slow-wave sleep. *An R Acad Nac Med* 116: 209-224.
- Reinoso-Suárez F (2005) Neurobiología del sueño. *Rev Med Univ Navarra* 49: 10-17.
- Reinoso-Suárez F, de Andrés I (1976) Brain structures and sleep. *Trab Inst Cajal Invest Biol* 68: 39-68.
- Reinoso-Suárez F, Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E, De Andrés I (1990) Thalamic connections of the oral pontine tegmentum sites whose cholinergic stimulation produces enhancement of paradoxical sleep signs. In: Mancia M, Marini G (eds). *The Diencephalon and Sleep*. Raven Press, New York. pp 49-63.
- Reinoso-Suárez F, De Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E (1994) Location and anatomical connections of paradoxical sleep induction site in the cat ventral pontine tegmentum. *Eur J Neurosci* 6: 1829-1836.
- Reinoso-Suárez F, De Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, De la Roza C, Núñez A, Garzón M (1999) The anatomy of dreaming and REM sleep. *Eur J Anat* 3: 163-175.
- Reinoso-Suárez F, De Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, Garzón M (2001) Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM sleep. *Sleep Med Rev* 5: 63-77.
- Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E, Reinoso-Suárez F (2000) Serotonergic connections to the ventral oral pontine reticular nucleus: implication in paradoxical sleep modulation. *J Comp Neurol* 418: 93-105.

- Rodrigo-Angulo ML, Rodríguez-Veiga E, Reinoso-Suárez F (2005) A quantitative study of the brainstem cholinergic projections to the ventral part of the oral pontine reticular nucleus (REM sleep induction site) in the cat. *Exp Brain Res* 160: 334-343.
- Rodrigo-Angulo ML, Heredero S, Rodríguez-Veiga E, Reinoso-Suárez F (2006) Thalamic and hypothalamic GABAergic projections to the cat brainstem REM-sleep induction area. *J Sleep Res* 15 suppl 1: 99.
- Saito H, Sakai K, Jouvet M (1977) Discharge patterns of the nucleus parabrachialis lateralis neurons of the cat during sleep and waking. *Brain Res* 134: 59-72.
- Sakai K (1980) Some anatomical and physiological properties of ponto-mesencephalic tegmental neurons with special reference to the PGO waves and postural atonia during paradoxical sleep in the cat. In: *The reticular formation revisited*. Hobson JA, Brazier MAB (eds) Raven Press, New York. pp 427-447.
- Sakai K (1985) Anatomical and physiological basis of paradoxical sleep. In: *Brain mechanisms of sleep*. McGinty DJ, Drucker-Colin R, Morrison A, Parmeggiani PL (eds). Raven Press, New York. pp 111-137.
- Sakai K, El Mansari M, Lin JS, Zhang G, Vanni-Mercier G (1990) The posterior hypothalamus in the regulation of wakefulness and paradoxical sleep. In: *Mancia M and Marini G (eds). The Diencephalon and Sleep*. Raven Press, New York. pp 171-198.
- Sánchez-Valle ME, De la Roza C, Reinoso-Suárez F (2000) Connections between the ventral part of the oral pontine reticular nucleus and the medullary reticular magnocellular nucleus: A light and electron microscope study. *Eur J Neurosci* 12 suppl 11: 163.
- Sandford LD, Parris B, Tang X (2002) GABAergic regulation of the central nucleus of the amygdala: implication for sleep control. *Brain Res* 956: 276-284.
- Sanford LD, Tang X, Xiao J, Ross RJ, Morrison AR (2003) GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *J Neurophysiol* 90: 938-945.
- Sandford LD, Yang L, Tang X, Dong E, Ross RJ, Morrison AR (2006) Cholinergic regulation of the central nucleus of the amygdala in rats: effects of local microinjections of cholinomimetics and cholinergic antagonists on arousal and sleep. *Neuroscience* 141: 2167-2176.
- Saper CB, Chou TC, Scammell TE (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* 24: 726-731.
- Saper CB, Scammell TE, Lu J (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437: 1257-1263.
- Sapin E, Lapray D, Bérard A, Goutagny R, Léger L, Ravassard P, Clément O, Hanriot L, Fort P, Luppi P-H (2009) Localization of the brainstem GABAergic neurons controlling paradoxical (REM) sleep. *PLoS ONE* 4: e4272.
- Sastre JP, Sakai K, Jouvet M (1981) Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep?. *Brain Res* 229: 147-161.
- Scheibel ME, Scheibel AB (1958). Structural substrates for integrative patterns in the brainstem reticular cores. In: *Reticular formation of the brain*. In: *Reticular Formation of the Brain*. Jasper HH, Proctor LD, Knighton RS, Noshay WC and Costello RT (eds). Little, Brown and Co., Boston. pp 31-55.

- Schenkel E, Siegel JM (1989) REM sleep without atonia after lesions of the medial medulla. *Neurosci Lett* 98: 159-165.
- Scherschlicht R (1985) Role for GABA in the control of the sleep-wakefulness cycle. In: *Sleep: neurotransmitters and neuromodulators*. Wauquier A, Monti JM, Gaillard JM (eds). Raven Press, New York. pp 237-249.
- Shiromani PJ, Kilduff TS, Bloom FE, McCarley RW (1992) Cholinergically induced REM sleep triggers Fos-like immunoreactivity in dorsolateral pontine regions associated with REM sleep. *Brain Res* 580: 351-357.
- Shouse MN, Siegel JM (1992) Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculo-pontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res* 571: 50-63.
- Siegel JM (1979) Behavioral functions of the reticular formation. *Brain Res Rev* 1: 69-105.
- Siegel JM (2000) Brainstem mechanisms generating REM sleep. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC (eds). *Principles and practice of sleep medicine*. Elsevier Saunders, Philadelphia. pp 112-133.
- Siegel JM, McGinty DJ (1977) Pontine reticular formation neurons: relationship of discharge to motor activity. *Science* 196: 678-680.
- Siegel JM, Wang RY (1974) Electroencephalographic, behavioral, and single unit effects produced by stimulation of forebrain inhibitory structures in cats. *Expl Neurol* 42: 28-50.
- Siegel JM, Nienhuis R, Tomaszewski KS, (1984) REM sleep signs rostral to chronic transections at the pontomedullary junction. *Neurosci Lett* 63: 247-288.
- Simon RP, Gershon MD, Brooks DC (1973) The role of the raphe nuclei in the regulation of the ponto-geniculo-occipital wave activity. *Brain Res* 58: 313-330.
- Spreafico R, De Biasi S, Battaglia G, Amadeo A (1990) Cortical, thalamic, and brainstem projections to the reticular nucleus of the thalamus (RNT): their possible implications in synchronizing processes. In: Mancina M, Marini G (eds). *The Diencephalon and Sleep*. New York: Raven Press. pp 263-278.
- Srividya R, Mallick HN, Kumar VM (2006). Differences in the effects of medial and lateral preoptic lesions on the thermoregulation and sleep in rats. *Neuroscience* 139: 853-864.
- Starzl TE, Taylor CW, Magoun HW (1951) Ascending conduction in reticular activating system, with special reference to the diencephalon. *J Neurophysiol* 14: 461-477.
- Steinbusch HWM, Mulder AH (1984). Immunohistochemical localization of histamine in neurons and mast cells in the rat brain. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol 3. Classical Transmitters in the CNS. Bjorklund A, Hokfelt T, Kuhar MJ (eds). Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp 126-140.
- Steriade M (1981) Mechanisms underlying cortical activation: Neuronal organization and properties of the midbrain reticular core and intralaminar thalamic nuclei. In: Pompeiano O, Ajmone-Marsan C (eds). *Mechanisms and perceptual awareness*. Raven Press, New York. pp 327-377.
- Steriade M, Hobson JA (1976) Neuronal activity during the sleep-waking cycle. *Progress Neurobiol* 6: 155-376.
- Steriade M, Deschênes M (1984) The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res Rev* 8: 1-63.
- Steriade M, Domich L, Oakson G, Deschênes M (1987) The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *J Neurophysiol* 57: 260-273.

- Steriade M, Paré D, Datta S, Oakson G, Curró-Dosi R (1990) Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves. *J Neurosci* 10: 2560-2579.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262: 679-685.
- Steriade M, Contreras D, Amzica F (1994) Synchronized sleep oscillations and their paroxysmal development. *Trends Neurosci* 17: 199-208.
- Steriade M, Jones EG, McCormick DA (1997) *Thalamus Vol I, Organization and Function*. Elsevier Science Ltd.
- Sterman MB, Clemente CD (1962) Forebrain inhibitory mechanisms: cortical synchronization induced by basal forebrain stimulation in the behaving cat. *Expl Neurol* 6: 91-102.
- Sterman MB, Knauss T, Lehmann D, Clemente CD (1965) Circadian sleep and waking patterns in the laboratory cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 19: 509-517.
- Sutcliffe JG, de Lecea L (2002) The hypocretins: setting the arousal threshold. *Nat Rev Neurosci* 3: 339-349.
- Suzuki SS, Siegel JM, Wu MF (1989) Role of the pontomedullary reticular formation neurons in horizontal head movements: an ibotenic acid lesion study in the cat. *Brain Res* 484: 78-93.
- Swanson LW, Sawchenko PE (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6: 269-324.
- Szymusiak R (1995) Magnocellular nuclei of the basal forebrain: substrates of sleep and arousal regulation. *Sleep* 18: 478-500.
- Szymusiak R, McGinty DJ (1986) Sleep-related neuronal discharge in the basal forebrain of cats. *Brain Res* 370: 82-92.
- Szymusiak R, McGinty DJ (1989) Sleep-waking discharge of basal forebrain projection neurons in cats. *Brain Res Bull* 22: 423-430.
- Szymusiak R, Alam N, Steiniger TL, McGinty D (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 803: 178-188.
- Tortelly A, Reinoso-Suárez F (1980) Projections to the superior colliculus from the dorsal hypothalamic area and other prosencephalic structures derived from the embryonic subthalamic longitudinal band of the diencephalon. *Neurosci Lett* 18: 257-260.
- Tortelly A, Reinoso-Suárez F, Llamas A (1980) Projections from non-visual cortical areas to the superior colliculus demonstrated by retrograde transport of HRP in the cat. *Brain Res* 188: 543-549.
- Trageser JC, Burke, KA, Masri RM, Li Y, Sellers L, Keller A (2006) State-dependent gating of sensory inputs by zona incerta. *J Neurophysiol* 96: 1456-1463.
- van Dongen PAM, Broekkamp DLE, Cools AR (1978) Atonia after carbachol microinjections near the locus coeruleus in cats. *Pharmacol Biochem Behav* 8: 527-532.
- Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M (1989) Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol* 127: 133-164.

- Vassalli A, Dijk D-J (2009) Sleep function: current questions and new approaches. *Eur J Neurosci* 29: 1830-1841.
- Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Legger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi P-H (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 4: 19.
- Villablanca JR (1974) Role of the thalamus in sleep control: sleep-wakefulness studies in chronic diencephalic and athalamic cats. In: Petre-Quadens O, Schlag J (eds). *Basic sleep mechanisms*. Academic, New York. pp 51-81.
- Villablanca JR, Marcus RJ (1972) Sleep-wakefulness, EEG and behavioral studies of chronic cats without neocortex and striatum: the “diencephalic” cat. *Arch Ital Biol* 110: 348-382.
- Villablanca JR, Marcus RJ, Olmstead CE (1976) Effects of caudate nuclei or frontal cortex ablations in cats. II: sleep-wakefulness, EEG and motor activity. *Exp Neurol* 53: 31-50.
- Vincent SR, Hökfelt T, Skirboll LR, Wu JY (1983) Hypothalamic gamma-aminobutyric acid neurons project to the neocortex. *Science* 220: 1309-1311.
- von Economo C (1931) *Encephalitis lethargica: its sequelae and treatment*. London, England: Oxford University Press.
- Wang HL, Morales M (2009). Pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 29:340-358.
- Watson CJ, Lydic R, Baghdoyan HA (2007) Sleep and GABA levels in the oral part of the rat pontine reticular formation are decreased by local and systemic administration of morphine. *Neuroscience* 144: 375-386.
- Xi M-C, Morales FR, Chase MH (1999a) Evidence that wakefulness and REM sleep are controlled by GABAergic pontine mechanism. *J Neurophysiol* 82: 2015-2019.
- Xi M-C, Morales FR, Chase MH (1999b) Evidence that wakefulness and REM sleep are controlled by a GABAergic pontine mechanism. *J Neurophysiol* 82: 2015-2019.
- Xi M-C, Morales FR, Chase MH (2001a) Induction of wakefulness and inhibition of active (REM) sleep by GABAergic processes in the nucleus pontis oralis. *Arch Ital Biol* 139: 125-145.
- Xi M-C, Morales FR, Chase MH (2001b) The motor inhibitory system operating during active sleep is tonically suppressed by GABAergic mechanisms during other states. *J Neurophysiol* 86: 1908-1915.
- Xi M-C, Morales FR, Chase MH (2004) Interactions between GABAergic and cholinergic processes in the nucleus pontis oralis: Neuronal mechanisms controlling active (rapid eye movement) sleep and wakefulness. *J Neurosci* 24: 10670-10678.
- Yamamoto K, Mamelak AN, Quattrochi JJ, Hobson JA (1990) A Cholinergic desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: spontaneous and drug-induced neuronal activity. *Neuroscience* 39: 295-304.
- Yen CT, Conley M, Hendry SH, Jones EG (1985) The morphology of physiologically identified GABAergic neurons in the somatic sensory part of the thalamic reticular nucleus in the cat. *J Neurosci* 5: 1316-1338.

## 8. *ANEXO*